

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Hals-Nasen-Ohrenklinik und Poliklinik  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. A. Bier)

Sauerstoffkonzentrationen  
in tissue-engineerten Knorpelkonstrukten,  
besiedelt mit humanen Chondrozyten

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Zahnheilkunde  
genehmigten Dissertation.

Stefanie Barbara Schmid-Zellner

2012



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Hals-Nasen-Ohrenklinik und Poliklinik  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. A. Bier)

Sauerstoffkonzentrationen  
in tissue-engineerten Knorpelkonstrukten,  
besiedelt mit humanen Chondrozyten

Stefanie Barbara Schmid-Zellner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Zahnheilkunde  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. R. Staudenmaier
2. Univ.-Prof. Dr. H. Deppe

Die Dissertation wurde am 16.05.12 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.07.2012  
angenommen.

Meiner Familie gewidmet  
In Erinnerung an meinen Großvater

---

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
2	Allgemeiner Teil .....	8
2.1	Tissue Engineering.....	8
2.2	Knorpelgewebe.....	10
2.3	Knorpelbedarf und Knorpelersatz .....	11
2.4	Knorpelersatz durch Tissue Engineering.....	14
2.4.1	Zellmaterial.....	16
2.4.2	Zellträger.....	17
2.4.3	Wachstumsfaktoren und Kulturbedingungen.....	20
2.4.4	Ernährung/Sauerstoffversorgung des Knorpels.....	21
2.5	Messmethoden von Sauerstoffkonzentration und Sauerstoffpartialdruck.....	21
2.6	Zielsetzung der Arbeit.....	23
3	Material und Methoden.....	25
3.1	Knorpelgewebe.....	28
3.2	Trägermaterial.....	28
3.3	Zellkulturtechniken.....	29
3.3.1	Gewebeverdau.....	29
3.3.2	Bestimmung der Zellzahl / Vitalität.....	30
3.3.3	Monolayerkultur.....	30
3.4	Besiedelung der Polyurethan-Zellträger.....	31
3.4.1	Zellkleberherstellung.....	31
3.4.2	Besiedelung der Polyurethanzellträger .....	32
3.5	In Vitro-Messung des Sauerstoffgehalts im Konstruktinneren.....	33
3.5.1	Messsonde .....	33
3.5.2	Versuchsaufbau .....	35
3.5.3	Versuchsgruppen .....	36
3.6	Bestimmung des Nassgewichts .....	36
3.7	Lebend-/ Totfärbung mittels Fluoreszenz.....	37
3.8	Biochemische Verfahren.....	39
3.8.1	Papainverdau .....	39
3.8.2	Quantifizierung der Glykosaminoglykane (DMMB-Assay) .....	39
3.8.3	Bestimmung des DNA-Gehalts/Zellzahl (Hoechst-Assay) .....	40
4	Ergebnisse.....	42
4.1	Knorpelisolierung und Monolayer-Kultur.....	42
4.2	3D-Kultur.....	42
4.3	Messung des Sauerstoffgehalts.....	43
4.4	Nassgewicht der Konstrukte .....	59
4.5	Vitalität.....	60

4.6	Biochemische Verfahren.....	61
4.6.1	Gehalt an Glykosaminoglykanen .....	61
4.6.2	Bestimmung DNA-Gehalt/Zellzahl .....	63
5	Diskussion.....	66
5.1	Sauerstoffmessverfahren .....	66
5.2	Kultivierung in unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen.....	68
5.3	Sauerstoffkonzentrationen in Polyurethankonstrukten.....	69
5.4	Nassgewicht, Gehalt an Glykosaminoglykanen und Gesamtzellzahl.....	72
5.5	Ausblick und Perspektiven.....	74
6	Zusammenfassung .....	76
7	Literaturverzeichnis .....	78

## 1 Einleitung

Der Ersatz zerstörten Gewebes ist eine der größten Herausforderungen der modernen Medizin. Dieser Ersatz kann notwendig werden durch Traumata, Tumoren, entzündliche Veränderungen oder Verschleiß (Langer 1993).

Im klinischen Alltag gibt es derzeit zur Rekonstruktion dieser Gewebe verschiedene Ansätze. Zum einen werden künstliche Implantate, wie Gelenkprothesen verwendet, zum anderen kommen verarbeitete, nicht vitale Biomaterialien wie Knochenersatzmaterial zum Einsatz. Bedeutend ist auch die Transplantation gesunden Gewebes desselben (autolog) oder eines anderen Patienten (allogen). Alle diese Möglichkeiten sind mit Einschränkungen oder Nachteilen behaftet, wie beispielsweise inadäquate Funktionen bei künstlichen Materialien oder Knappheit von Gewebeentnahmestellen bei Verpflanzungen (Langer 1993, Vacanti 1999). Einen neueren Ansatz in Bezug auf die regenerative Medizin bieten die Methoden des Tissue Engineering.

Tissue Engineering ist ein interdisziplinärer Forschungszweig, der Techniken der Material- und Biowissenschaften mit der klinischen Forschung, zur Entwicklung von lebendem Ersatzmaterial von Geweben und Organen, zusammenführt. Ziel ist die Entwicklung von Gewebeersatz, der die Gewebefunktionen wiederherstellt, erhält oder verbessert (Skalak 1988, Langer 1993).

Durch das Tissue Engineering von Knorpel ist es möglich, aus einer kleinen Gewebeprobe vom Patienten, größere Mengen an autologen Knorpelzellen zu kultivieren und damit entsprechende Defekte zu rekonstruieren. Dreidimensionale Zellträger können so mit körpereigenen Zellen besiedelt werden, was den Vorteil mit sich bringt, dass Immunreaktionen mit Entzündungen, Resorptionen oder Abstoßungsreaktionen unterbleiben (Kawabe 1991).

Trotz des immensen Forschungsaufwands haben bisher nur wenige Anwendungen Eingang in die Klinik gefunden. Gründe hierfür sind die hohen Anforderungen an tissue-engineerte Materialien wie beispielsweise Knorpel, der hohen Druck- und Scherkräften gleichermaßen standhalten können muß (Stading 1999). Bisher können lediglich Schichten bis zu einigen Hundert Mikrometern in einem zellbesiedelten Gerüst am Leben erhalten werden (Obradovic 1999).

Eine zentrale Rolle im Tissue Engineering spielt die Nähr- und Sauerstoffversorgung. Bei unzureichender Zufuhr ist die Entwicklung des Gewebes vermindert oder bleibt vollkommen aus.

Da adultes Knorpelgewebe über Diffusion ernährt wird, geht man davon aus, dass Sauerstoff aufgrund seines eingeschränkten Lösungsvermögens in Blut oder Nährmedium einer der ersten limitierenden Faktoren für das Überleben von tissue-engineertem Gewebe ist (Malda 2004a, 2004b).

Um die Kulturbedingungen für dieses Gewebe zu optimieren ist es ein wichtiger Schritt, den Sauerstoffgehalt im Zentrum eines zellbesiedelten Gerüsts zu erfassen.

Frühere Studien benutzten Messtechniken zur Erfassung des Sauerstoffgehalts in Konstrukten mit eingeschränkter räumlicher Auflösung (Bacon 1987, Backman 1991), bestimmten den Sauerstoffpartialdruck im Kulturmedium (Obradovic 1999) oder konzentrierten sich auf Knorpelzellen tierischen Ursprungs (Kellner 2002, Kuang 2007).

In Anlehnung an Vorarbeiten innerhalb der Forschungsgruppe AG Tissue Engineering, Klinikum rechts der Isar, zur Messung von Sauerstoff in nativen Knorpelbiopsien, wurden im Rahmen dieser Arbeit Sauerstoffmessungen im Zentrum von Polyurethan(PU)-Schäumen in Abhängigkeit von ihrer Kultivierungsdauer durchgeführt, welche im Vorfeld mit humanen Chondrozyten beimpft wurden. Zur Messung des Sauerstoffgehalts kamen Glasfaser-Mikrosensoren der Firma PreSens zur Anwendung, die über das Prinzip der Lumineszenzlöschung Sauerstoffkonzentrationen erfassen können und eine kontinuierliche und



exakte Sauerstoffbestimmung mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung erlauben. Die Polyurethan-Konstrukte wurden im Anschluss mikroskopisch auf ihre Vitalität und fluorimetrisch bzw. photometrisch auf ihre Gesamtzellzahl und ihren Gehalt an Knorpelmatrix hin untersucht.

## 2 Allgemeiner Teil

### 2.1 Tissue Engineering

Die Degeneration von Gewebe und das Versagen ganzer Organe ist eines der häufigsten und kostspieligsten Probleme der heutigen Gesundheitsversorgung (Vacanti 1999). Oft ist die Gewebe- oder Organtransplantation der letzte mögliche Schritt, das Leben des Patienten zu erhalten. Viele der Patienten versterben während sie auf der Transplantatwarteliste stehen, da der Bedarf an Organen bei weitem nicht durch Organspender gedeckt werden kann. Oft können künstliche, lebenserhaltende Systeme nur eine begrenzte kritische Zeitspanne überbrücken. Auch bei der Rekonstruktion von Geweben wie Haut, Knochen oder Knorpel bedarf es einer Ersatzstruktur. Wie bei der Organtransplantation besteht auch beim Decken dieser Defekte das Risiko, dass es zu Infektionen, Resorptionen und Abstoßungsreaktionen durch das Immunsystem kommen kann. Methoden bei denen alloplastisches oder allogenes Material verwendet wird, scheitern oft an Fremdkörperreaktionen und an der Wanderung des Implantats. Die Möglichkeit körpereigenes, autologes Gewebe als Ersatzstruktur zu verwenden ist von der Tatsache geprägt, dass es nur in sehr begrenztem Umfang zur Verfügung steht.

Der große Bedarf an Gewebeersatz und die damit verbundenen Probleme und Risiken ließen das Forschungsgebiet des Tissue Engineering entstehen.

Das Konzept des Tissue Engineering besteht darin, neues Gewebe zum Ersatz oder zur Unterstützung von vorhandenem Gewebe und Organen zu schaffen. Dazu werden dem Patienten kleine Mengen an Gewebe entnommen und die benötigten Zellen durch verschiedene Präparations- und Kultivierungsverfahren isoliert und proliferiert, was durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren unterstützt werden kann. Bei ausreichender Zellzahl können in einem weiteren Schritt synthetische oder biologische

Trägermaterialien (Scaffolds, Konstrukte) besiedelt werden und diese dem Patienten schließlich zum Füllen eines Defektes retransplantiert werden.

Erste Anfänge des Tissue Engineering können bereits 1933 bei Bisceglie gefunden werden, der Tumorzellen einer Maus mit einer Polymermembran umschloss und sie in die Bauchhöhle eines Schweins implantierte (Bisceglie 1933). Im Jahr 1975 umgab Chick pankreatische Inselzellen mit einer semipermeablen Membran, um die Glukose-Steuerung von Patienten zu verbessern, die an Diabetes mellitus litten (Chick 1975). In den 80er Jahren wurde an einem Gerüst aus Kollagengel und Glykosaminoglykanen geforscht, welches bei Verbrennungen die Regeneration der Dermis fördern kann (Burke 1981). Weiterentwicklungen dieser Technik gehören heute zur klinischen Therapie.

Ein weiterer großer Fortschritt war die Entwicklung von größeren dreidimensionalen Gerüsten, die eine hohe Anzahl von Zellen aufnehmen können und später, implantiert in den Körper, vaskularisiertes Gewebe bilden können. Dabei wurden als Gerüstmaterial stark poröse, biologisch abbaubare, synthetische Polymere benutzt. Durch das Einsprossen von neuen Gefäßen in das implantierte Gerüst, konnte das Gewebe dauerhaft mit Nährstoffen versorgt werden und so vital erhalten werden (Vacanti 1988).

Eine große Herausforderung stellt bis heute die Wahl des optimalen Zelltyps für die Züchtung von Gewebe dar. In den Focus sind hier in den letzten Jahren vor allem adulte Zellen, wie beispielsweise differenzierte Chondrozyten und auch fetale Stammzellen gerückt (Langer 2007).

Mit den Forschungserfolgen bei unterschiedlichsten Gewebearten und dem Potential, das synthetische Materialien besitzen, hat Tissue Engineering als Forschungsgebiet große Beachtung gefunden.

Trotz dieser Erfolge liegt der klinische Einsatz von tissue-engineertem Gewebe deutlich hinter den anfangs hohen Erwartungen zurück. Probleme bereitet oft eine unzureichende Nährstoffversorgung, bedingt durch eine fehlende vaskuläre Integration in vivo. Dadurch können in vielen Fällen nur sehr dünne Schichten des gezüchteten Gewebes vital erhalten

werden. Die mechanischen Anforderungen im Körper sind sehr hoch und können die Stabilität des eingesetzten Gewebes überschreiten, was letztendlich zum Verlust des implantierten Gewebes führen kann.

## 2.2 Knorpelgewebe

Knorpelgewebe zählt zum Stützgewebe des Menschen. Besondere Eigenschaften sind seine Druckelastizität, das heißt, er ist bis zu einem gewissen Grad durch Druck und Zug verformbar und seine Schneidbarkeit, da er fast nur aus organischen Materialien besteht.

Knorpelgewebe geht aus Mesenchymzellen hervor, die sich in Vorknorpelzellen umwandeln und sich zu größeren Zellhaufen zusammenlagern. In diesen Zellen, zu diesem Zeitpunkt Chondroblasten genannt, treten viel endoplasmatisches Retikulum, ein großer Golgi-Apparat und zahlreiche Mitochondrien auf, die Knorpelgrundsubstanz und Fasern bilden und sezernieren. Die synthetisierten Substanzen, Interzellularsubstanz oder Extrazellulärmatrix (ECM) genannt, werden nach allen Seiten abgegeben, wodurch sich die Chondroblasten einmauern und zwangsläufig auseinanderrücken. Nach Beendigung des Knorpelwachstums liegen meist nur noch die bei der letzten Teilung entstandenen Chondroblasten beieinander.

Sich nicht mehr teilende Chondroblasten werden Chondrozyten genannt. Sie bilden weiter Extrazellulärmatrix und erhalten diese.

Die Grundsubstanz des Knorpels besteht aus zu etwa 60-70% Wasser, zu 30-35% aus den Glykosaminoglykanen Chondroitinsulfat, Hyaluronsäure und Keratansulfat, die in Proteoglykanen mit Kollagenfasern, überwiegend vom Typ II verbunden sind. Etwa 4% machen mineralische Anteile aus.

Die Glykosaminoglykane und die relativen Anteile von Kollagen verleihen dem Knorpel seine Festigkeit, der Proteinanteil der Proteoglykane, durch das Wasserbindungsvermögen die elastischen Eigenschaften.

Die verschiedenen Knorpelarten umfassen den hyalinen Knorpel, Faserknorpel und den elastischen Knorpel. Der hyaline Knorpel kommt am

häufigsten im menschlichen Körper vor. Er besteht aus Chondrozyten, Grundsubstanz und Kollagenfasern und erscheint makroskopisch bläulich, milchartig und durchscheinend. Die Anordnung der Kollagenfasern, hauptsächlich Typ II, aber auch in geringem Maße Typ IX und XI, orientiert sich an der mechanischen Beanspruchung (trajektoriieller Verlauf).

Entscheidend für die mechanischen Eigenschaften des hyalinen Knorpels sind der trajektorielle Verlauf der Kollagenfasern, der Gehalt der Grundsubstanz an Hyaluronsäure und das Verhältnis von Keratansulfat zu Chondroitinsulfat.

Hyaliner Knorpel kommt vor im Nasenknorpel, Gelenkknorpel, in den Luftwegen, in großen Teilen des Kehlkopfs, am Rippenansatz und im knorpeligen embryonalen Skelett.

(Schiebler 1995, Archer 2002, Moll 2006)

### 2.3 Knorpelbedarf und Knorpelersatz

Knorpelgewebe hat im Körper wichtige Funktionen wie das Absorbieren von Druckkräften, das Überleiten der Kräfte auf den Knochen oder das Herabsetzen der Reibung in den Gelenken (Malda 2003).

In der Medizin gibt es in verschiedenen Bereichen einen großen Bedarf, Knorpelgewebe zu ersetzen. Knorpeldefizite bestehen bei einer Vielzahl von Gelenkerkrankungen, Traumata, Tumorerkrankungen oder angeborenen Defekten.

Zu einem großen Teil ist dieser Bedarf durch die geringe Regenerationsfähigkeit des Knorpels bedingt. Knorpelgewebe ist avaskulär und besitzt eine eingeschränkte Fähigkeit zur Selbstheilung (Buckwalter 1990, Freed 1995, Barone 1996). In begrenztem Ausmaß kann eine Regeneration vom Periost oder Perichondrium ausgehen, das bei Läsionen oder chronisch-entzündlichen Prozessen aber schnell überschritten wird. Eine Vermehrung der Zellen wie in der Embryonalentwicklung ist im adulten Knorpel nicht mehr möglich (Leonhardt 1990).

Von der begrenzten Regenerationsfähigkeit ist nicht nur hyaliner Gelenkknorpel, sondern auch Strukturknorpel im Kopf-Hals-Bereich betroffen (Verwoerd-Verhoef 1998). Daher besteht auch auf dem Gebiet der Rekonstruktionschirurgie ein hoher Bedarf an Knorpelgewebe, beispielsweise zur Therapie eines angeborenen oder traumatischen Ohrmuschelverlusts, oder zur Defektdeckung nach Trauma- und Tumorresektionen im Gesichtsbereich (Becker 1986, Probst 2008).

Derzeit stehen in der Medizin unterschiedliche Möglichkeiten zum Ersatz von Gewebe und insbesondere von Knorpelgewebe zur Verfügung. Zu den etablierten Methoden gehört die Transplantation von Knorpelgewebe oder Ersatzmaterialien unterschiedlicher Herkunft.

Bei autologen Transplantationen wird körpereigenes Gewebe innerhalb eines Individuums verpflanzt. Dieses Verfahren wird häufig angewandt, da es ohne nennenswertes Infektionsrisiko genutzt werden kann und das Risiko einer Transplantatabstoßung minimal ist (Osch 2000). Zudem weisen körpereigene Transplantate nur geringe Resorptionserscheinungen sowie eine bleibende Transplantatvitalität auf (Bujia 1990, Hammer 1992).

Dennoch bestehen bei autologen Transplantaten eine Reihe von Nachteilen. Es sind nur wenige Areale für eine Gewebespende geeignet. Zudem kann an der Entnahmestelle nur begrenzt Gewebe entnommen werden, ohne einen störenden Defekt zu setzen. So steht Knorpelgewebe nicht immer in ausreichendem Umfang oder Qualität zur Verfügung. Zusätzlich besteht eine intraoperative und postoperative Hebedefekt morbidity (Osch 2001). Besonders bei der Verwendung von autologem Rippenknorpel besteht die Gefahr postoperativer Verkalkung, was zu negativen Einflüssen auf das rekonstruktive Ergebnis führen kann (Hammer 1992).

Neben der Verwendung von autologen Transplantaten spielen auch allogene Transplantate eine gewisse Rolle. Dieses Transplantat stammt aus einem Individuum der gleichen Spezies wie bei der klassischen Organspende.

Dem Patienten bleibt beim allogenen Transplantat eine zusätzliche Wundsetzung an der Entnahmestelle erspart, darüber hinaus steht es in weit größerem Ausmaß zur Verfügung als autologes Knorpelgewebe.

Abstoßungsreaktionen und Infektionen sind die Hauptprobleme beim allogenen Transplantat. Ein zusätzliches Problem im Kopf-Hals-Bereich sind mögliche Teilresorptionen des verpflanzten Gewebes, die das gewünschte funktionelle und ästhetische Ergebnis beeinträchtigen (Hammer 1992).

Zur Verminderung von Abstoßungsreaktionen oder Infektionsübertragungen muss das gespendete Gewebe konserviert werden, da trotz sorgfältigem Screening der Spender ein Restrisiko für eine Übertragung von Infektionskrankheiten besteht. Trotz der Konservierung kann eine Übertragung von HIV-Infektionen oder subzellulären Erregern wie Prionen damit allerdings nicht sicher ausgeschlossen werden, wodurch ihr Einsatz heutzutage kritisch zu beurteilen ist (Davis 1988, Brunner 1993, Skodacek 2005).

Xenogene Transplantate werden in der Klinik selten eingesetzt. Der Spender dieses Knorpels stammt aus einer anderen Spezies. Beim Einsatz konservierten Rinderknorpels zeigten sich hohe Resorptions- und Infektionsraten (Pellegrini 1990, Ferrante 1993, Krafft 1994), die in der Folge zur Zerstörung des Transplantats führen können (Gibson 1955, Rotter 1996).

Unter alloplastischen Implantaten versteht man anorganische, synthetische Materialien, die in einen Organismus implantiert werden können. Dieser Knorpelersatz wird bei einigen Operationen häufig verwendet, wie beispielsweise der alloplastische Gelenkersatz in der Orthopädie oder der Stützgewebersatz in der rekonstruktiven Kopf-Hals-Chirurgie mit Trikalziumphosphatkeramiken (Hammer 1992, Skodacek 2005).

Alloplastische Implantate können in jeglicher gewünschten Form und Größe hergestellt werden und sind praktisch in unbegrenztem Umfang

vorhanden. Trotz dieses Vorteils ist auch eine Reihe von Nachteilen gegeben.

Ein alloplastisches Implantat ist in seiner biomechanischen Beschaffenheit dem nativen Gewebe nicht gleichzusetzen. Es besteht die Gefahr bakterieller oder mykotischer Besiedelung, ungenügender Fixierung im Implantatbett und die Gefahr von Fremdkörperreaktionen mit Ausbildung einer Kapsel oder Abstoßung und Extrusion des Implantats. Zudem sind Materialermüdung mit Zerstörung oder Freisetzung toxischer Stoffe möglich. Alle Faktoren können zum Verlust des Implantats führen (Kastenbauer 1982, Hammer 1992).

#### 2.4 Knorpelersatz durch Tissue Engineering

Die beschriebenen gängigen Behandlungsmethoden für den Ersatz von Knorpelgewebe weisen relevante Nachteile auf. Eine andere, alternative Methode stellt das Tissue Engineering dar.

Da Knorpelgewebe keine Gefäße, Nerven oder Lymphgefäße besitzt, ist es nur sehr beschränkt zur Selbstheilung fähig (Freed 1995) und daher ein Zielgewebe im Bereich des Tissue Engineering (Malda 2003).

Knorpelzellen werden dabei aus einem Spendergewebe durch enzymatischen Verdau isoliert, bei Bedarf in vitro vermehrt und anschließend in dreidimensionale Gerüste eingebracht. Diese 3-D-Trägermaterialien können vorher in Größe und Form variiert werden, damit sie den bestehenden Defekt später optimal decken können (Abb.1).



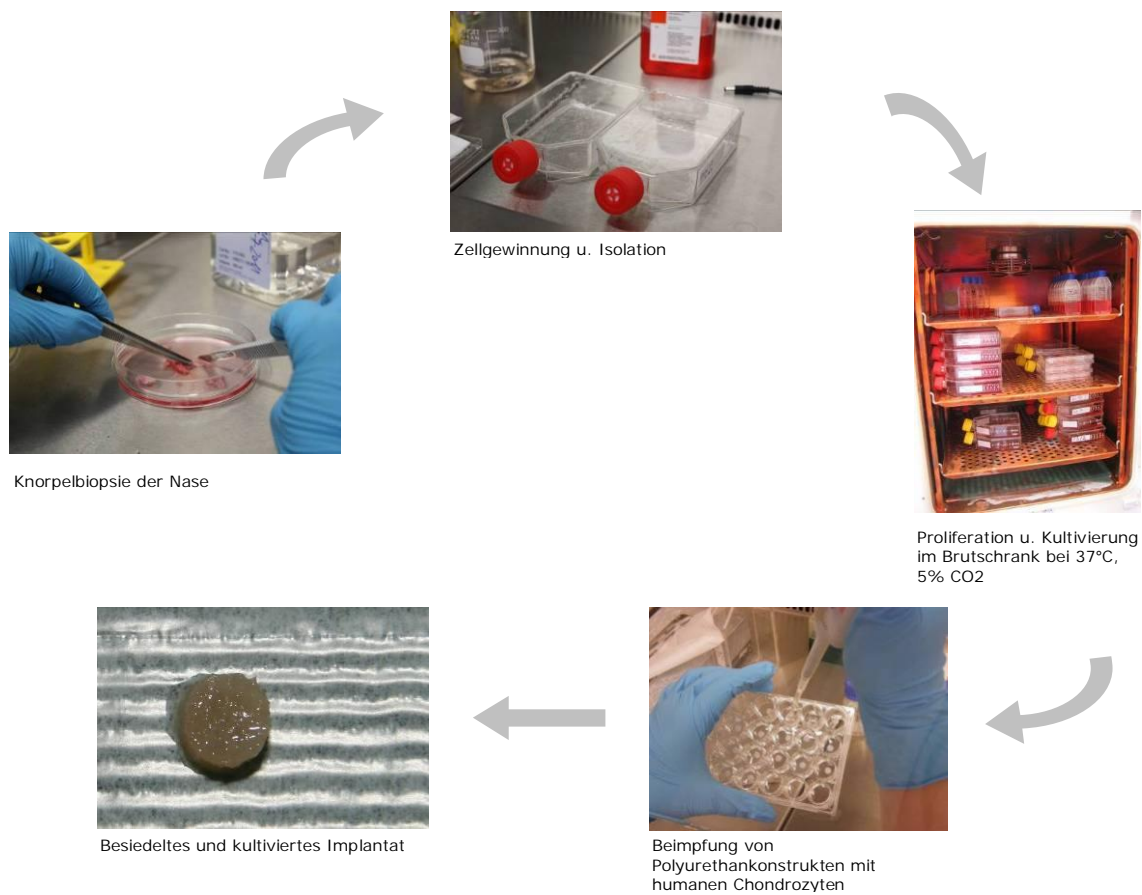


Abb. 1 Schematische Darstellung der Herstellung eines tissue-engineerten Implantats

Die Qualität des hierbei entstehenden Reparaturgewebes ist von sehr vielen Faktoren abhängig. Von großer Bedeutung sind vor allem das verwendete Zellmaterial, die mechanischen und biologischen Eigenschaften des Trägermaterials (Freed 1994) sowie die verwendeten Wachstumsfaktoren (Osch 2002). Als Ausgangsmaterial können verschiedene Zellen zur Züchtung von Knorpel verwendet werden, wie beispielsweise Chondrozyten (Aigner 1998) oder mesenchymale Stammzellen (Hwang 2006).

Im menschlichen Körper kommen drei Formen von Knorpelgewebe vor, hyaliner Knorpel, elastischer Knorpel und Faserknorpel. Hyaliner Knorpel ist der am meisten verbreitete Knorpeltyp beim Erwachsenen und auch der vorherrschende Typ auf den Gelenkflächen (Sobotta 2006). Aufgrund seiner gegenüber den anderen Arten überlegenen mechanischen Eigenschaften, konzentriert sich die Forschung auf ihn (Chung 2008).

#### 2.4.1 Zellmaterial

Ein weit verbreitetes Verfahren zur Züchtung von Knorpel besteht in der Verwendung von differenzierten Chondrozyten, die durch eine Knorpelbiopsie gewonnen wurden und danach durch enzymatischen Verdau isoliert wurden. Um größere Transplantate herstellen zu können, müssen sie in vitro stark vermehrt werden (Aigner 1998). Die zügige Vermehrung der Chondrozyten gelingt in der Monolayerkultur ohne größere Probleme (Buija 1993, Langer 1993). Leider verlieren die Zellen nach mehreren Zellteilungen ihre spezifischen Syntheseigenschaften im Sinne einer Einschränkung der Matrixproduktion. So wird nach der Expansion vermehrt knorpelunspezifisches Kollagen vom Typ I sezerniert, wie es in Faserknorpel vorkommt, anstatt knorpelspezifischem Kollagen vom Typ II. Zusätzlich ist eine Änderung der Zellmorphologie zu beobachten. Die normalerweise runden Chondrozyten erhalten eine spindelförmige Gestalt (Green 1971, Layman 1972). Dieser als Dedifferenzierung bezeichnete Vorgang ist reversibel, werden die dedifferenzierten Zellen wieder in einen dreidimensionalen Verbund gebracht (Desmukh 1976, Benya 1982). Es kommt zu einer Redifferenzierung und Reexpression von knorpelspezifischen Proteinen und es bildet sich ein Gewebe aus, das weitestgehend nativem Knorpel entspricht (Aigner 1998).

Durch die Optimierungen der Kulturbedingungen rücken Stammzellen auch im Tissue Engineering von Knorpel mehr und mehr ins Interesse.

Multipotente, mesenchymale Stammzellen sind Vorläuferzellen, die sich in Zellen unterschiedlicher Gewebe, wie beispielsweise Chondrozyten oder Osteozyten differenzieren können. Gewonnen werden diese Zellen meist aus Knochenmark und Fettgewebe. Durch Punktion des Knochenmarks können bone marrow-derived stem cells (BMSC) gewonnen werden. Ihre Differenzierung zu Chondrozyten gelingt durch eine dreidimensionale Kulturumgebung und der Verwendung von Differenzierungsfaktoren wie TGF- $\beta$  (Transforming-Growth-Factor- $\beta$ ) (Coleman 2007). Allerdings

erweisen sich die Menge an sezernierter Matrix und damit auch die mechanischen Eigenschaften der so gezüchteten Chondrozyten nicht als optimal (Mauck 2006).

Aus Fettgewebe können hingegen adipose-derived stem cells (ADSC) isoliert werden, welche mesenchymalen Ursprungs sind und sich ebenfalls in Chondrozyten differenzieren lassen. Dafür benötigen sie den Zusatz von TGF- $\beta$ , Ascorbinsäure und Dexamethason in einer dreidimensionalen Kulturmgebung (Zuk 2002). Das chondrogene Potenzial ist allerdings dem der BMSC's unterlegen, was sich insbesondere in der Zusammensetzung des Kollagens und der Matrixproteine äußert (Huang 2005).

Auch Zellen des Periost und des Perichondrium besitzen die Fähigkeit Knorpel zu bilden (Homminga 1990, Cohen 1995). Neuere Verfahren kombinieren Periostgewebe mit einer Chondrozytensuspension zur Defektauffüllung bei tiefen Knorpeldefekten im Kniegelenk (Brittberg 1994). Bei diesem Verfahren lassen sich allerdings nur kleinere, umschriebene Knorpeldefekte füllen. Auch Studien zur Verwendung von Perichondrozyten zur Nutzung der Vorläuferzellen liefern vielversprechende Ergebnisse. Nach der Kombination dieser Zellen mit Wachstums- und Differenzierungsfaktoren konnten in vitro matrixspezifische Bestandteile nachgewiesen werden (Osch 2000).

Einen weiteren Zelltyp, der zur Züchtung von Knorpel verwendet werden kann, stellen Fibroblasten dar. Sie kommen zahlreich in der Haut vor und ihre Gewinnung ist wenig invasiv. Sie müssen jedoch erst in Richtung des chondrozytären Phänotyps differenziert werden, was unter Zugabe von Wachstumsfaktoren wie IGF-1 (Insulin-like-Growth-Factor-1) und in einer Kultur auf Aggrecan gelingen kann (French 2004).

#### 2.4.2 Zellträger

Das Trägermaterial stellt gerade im Bereich des Tissue Engineering von Knorpel einen wichtigen Faktor dar, die Auswahl ist von entscheidender Bedeutung.

Das verwendete Biomaterial sollte bestimmte Voraussetzungen erfüllen. Es sollte zum einen dreidimensional sein und eine hohe innere Porosität besitzen, um die Diffusion nicht einzuschränken und um einen ungehinderten Abtransport von metabolischen Abfallprodukten zu gewährleisten. Die Porosität von nativem Knorpelgewebe beträgt circa 78% (Armstrong 1982).

Ferner muss es genügend Freiraum bieten, damit sowohl Zellwachstum als auch Matrixproduktion ungehindert ablaufen können. Das Material soll biokompatibel und resorbierbar sein und einem kontrollierten Degradationsprozess mit definierter Resorptionsrate unterliegen. Materialoberflächen sollen Adhäsion, Proliferation und Differenzierung der Zellen ermöglichen. Das Gerüst muss sich gut in das umliegende Gewebe integrieren können und während der Degradationsphase ausreichend stabil bleiben. Es stellt nur eine Leitschiene für das Knorpelgewebe dar und soll eine ausreichende mechanische Stabilität besitzen, bis das wachsende Gewebe selbst stark genug ist die physiologischen Kräfte zu tragen (Hutmacher 2000, Lu 2001, Woodfield 2002, Yang 2002, Rotter 2004).

Es gibt eine Fülle von Biomaterialien im Bereich des Tissue Engineering, sie variieren von natürlichen Polymeren über Copolymere bis zu synthetischen, bioabbaubaren Polymeren. Verwendet werden beispielsweise Hyaluronsäure, Kollagen, Alginat, Fibrinkleber, Agarose und verschiedene resorbierbare Polymere wie Polyglycolsäure (PGA), Polylactonsäure (PLA) oder Polyurethan (PU). Aus manchen Materialien lassen sich verschiedene Formen herstellen wie beispielsweise Schwämme, Netze oder Gele.

Im Folgenden werden kurz einige der wichtigsten Ansätze dargestellt:  
Natürliche Polymergele, wie Fibrinkleber, Hyaluronsäure oder Kollagen, sind grundsätzlich gut zur Kultivierung von Chondrozyten geeignet und ermöglichen eine homogene dreidimensionale Verteilung (Burdick 2005, Eyrich 2007). Sie unterstützen damit das Zell- und Matrixwachstum. Redifferenzierungs- und Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$  (Transforming-

Growth-Factor- $\beta$ ) und IGF (Insulin-like-Growth-Factor) können diesen Systemen gut zugesetzt werden. Allerdings besteht bei natürlichen Polymeren das Risiko einer Immunreaktion (Chung 2008). Diese Gelsysteme besitzen in der alleinigen Verwendung eine mangelnde mechanische Stabilität und können Knorpelgewebe schwer in definierter Form bilden, weshalb sie oft in Kombination mit synthetischen Materialien verwendet werden. Dazu gehören beispielsweise Polyglycolsäure (PGA) oder Polyurethan (PU). Diese synthetischen Polymere besitzen eine relativ gute Gewebeverträglichkeit und eine hohe mechanische Stabilität. Sie lassen sich in gewünschten Formen und auf verschiedene Anforderungen hin herstellen (Chung 2008).

Eine wichtige Rolle beim Tissue Engineering von Knorpel spielt nicht nur das verwendete Material, sondern auch der Aufbau des Konstrukts, vor allem im Hinblick auf die Zellinteraktionen. Eingesetzt werden Hydrogele, Schwämme und Netzgerüste.

Hydrogele sind wasserhaltige, aber gleichzeitig wasserunlösliche Polymere. Durch ihre leichte Injizierbarkeit vermögen sie leicht Defekte unterschiedlicher Größe minimalinvasiv zu füllen. Hervorzuheben ist, wie bereits erwähnt, die Fähigkeit, eine homogene dreidimensionale Verteilung der Zellen zu unterstützen und somit die Redifferenzierung der Zellen zu begünstigen. Sie ermöglichen eine gute Nährstoffversorgung und können mechanische Impulse weiterleiten. Nachteilig ist ihre mangelnde mechanische Stabilität und Schrumpfungstendenzen in vivo (Chung 2008).

Schwämme sind poröse Konstrukte, deren Eigenschaften von den Faktoren Porengröße, Porosität und Interkonnektivität abhängen. Die Porosität bestimmt die Oberfläche, die zur Zelladhäsion zur Verfügung steht, während Porengröße und Interkonnektivität, die Zellinfiltration, Einwanderung und Matrixproduktion der Zellen beeinflussen (Bhardwaj 2001). Sie sind sehr stabil und können in individuellen Formen hergestellt werden. Als Materialien von Schwämmen eignen sich beispielsweise

Polylactonsäure (Sato 2004), Kollagen (Vickers 2006) oder Hyaluronsäure (Solchaga 2005).

Die Verwendung von gewebten oder ungewebten Netzwerken aus Fasern stellt eine weitere Möglichkeit für Matrizen dar. Das Verhalten der Zellen wird dabei hauptsächlich vom Durchmesser, der Richtung und dem Abstand der Fasern im Netzwerk beeinflusst. Nicht gewebte Netze besitzen ein größeres Volumen und eine größere Oberfläche, die eine Zelladhäsion erleichtert. Gewebte Netze sind dagegen mechanisch stabiler. Am häufigsten finden bei Netzen Materialien wie Polylactonsäure (PLA), Polyglycolsäure (PGA) oder Polycaprolacton (PCL) Verwendung (Chung 2008).

#### 2.4.3 Wachstumsfaktoren und Kulturbedingungen

Wachstumsfaktoren können sowohl die Proliferationsrate steigern als auch die Redifferenzierung von vermehrten Chondrozyten optimieren. Es handelt sich dabei um Peptide oder Proteine, die von vielen Zellen und Zellgruppen synthetisiert werden und in unterschiedlicher Weise die Vermehrung und Differenzierung von Zelltypen beeinflussen. Insulin-like-Growth-Factor (IGF) steigert beispielsweise die Synthese von extrazellulärer Matrix (ECM) und stimuliert wie Insulin die Proliferationsrate. Die Wachstumsfaktoren Transforming-Growth-Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und Fibroblast-Growth-Factor (FGF) unterstützen sowohl die Differenzierung von Stammzellen zu Chondrozyten als auch die Proliferation von Chondrozyten selbst (Rosier 1989, Kellner 2001, Veilleux 2005).

Knorpelgewebe ist im Körper Sauerstoffmangel und diskontinuierlichen mechanischen Belastungen ausgesetzt. Es wird deshalb versucht diese Stimuli zu nutzen, um die Qualität des gezüchteten Gewebes zu optimieren. Dies wird zum einen durch hydrostatischen Druck versucht, der sich positiv auf Proliferation und Kollagen II-Bildung auswirken kann (Scherer 2004, Hu 2006). Zum anderen wird der Effekt von dynamischer Kompression in vitro auf das Knorpelgewebe untersucht (Davisson 2002,

Waldman 2006). Individuell angepasst an den gezüchteten Zelltyp, die Dichte der ausgesäten Zellen und das verwendete Trägermaterial kann dynamische Kompression stimulierende Effekte auf Knorpel, Chondrozyten und Stammzellen haben (Chung 2008).

#### 2.4.4 Ernährung/Sauerstoffversorgung des Knorpels

Im Gegensatz zu fetalem Knorpel, ist ausdifferenzierter Knorpel gefäß-, lymph- und nervenfrei. Die Chondrozyten werden mittels Diffusion vom gefäßhaltigen Perichondrium (Knorpelhaut) aus oder beim Gelenkknorpel aus der Synovia (Gelenkflüssigkeit) mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt, wodurch die Knorpeldicke limitiert ist (Moll 2006). An der Knorpeloberfläche liegt die Sauerstoffkonzentration physiologischerweise bei ~10%, in den innersten Schichten bei ~1% O<sub>2</sub> (Grimshaw 2000).

Knorpelzellen leben in sauerstoffarmer (hypoxer) Umgebung, ein gewisser Gehalt an Sauerstoff ist aber für das Überleben der Zellen nötig. Sauerstoff hat die zentrale Rolle in der mitochondrialen Atmungskette und hat Signalfunktion in der Regulation des Zellmetabolismus (Malda 2003). Abgesehen davon, dass Sauerstoff ein essentieller Nährstoff ist, beeinflusst er die Aktivität von Chondrozyten und die Produktion von Extrazellulärmatrix. Aufgrund seines geringen Lösungsvermögens, wird Sauerstoff als einer der ersten limitierenden Faktoren für Chondrogenese gesehen (Lane 1997, Domm 2002, Malda 2003).

Die genaue Rolle des Sauerstoffs und die Vorgänge in tissue engineered Knorpelgewebe sind immer noch unklar, die Forschungsergebnisse zahlreicher Untersuchungen werden kontrovers diskutiert (Malda 2003).

#### 2.5 Messmethoden von Sauerstoffkonzentration und Sauerstoffpartialdruck

In einem Gasmisch ist jedes Einzelgas entsprechend seiner Konzentration am Gesamtdruck beteiligt. Der Sauerstoffpartialdruck der Luft entspricht, abhängig von Luftfeuchte und Temperatur, dem prozentualen Sauerstoffanteil am Gesamtluftdruck und beträgt

~160mmHg (21% des aktuellen Luftdrucks). Die in einigen Publikationen verwendete Einheit Torr entspricht 1mmHg (Kühn 2005).

Den Weg zu einer nichtinvasiven Methode der Sauerstoffmessung bereitete Jobsis, 1977. Dabei wurde im Nahinfrarot-Bereich die Umwandlung der farbtragenden Gruppe Hb/HbO<sub>2</sub> aufgezeichnet (Jobsis 1977; Wang 2004). Aufgrund der fehlenden Blutzirkulation im avaskulären Knorpel kann diese Methode bei Chondrozyten nicht angewandt werden.

Konventionell wird die Sauerstoffkonzentration von Zellen elektrochemisch mithilfe einer Clark-Elektrode bestimmt (Clark 1956). Dieses polarographische Prinzip der Sauerstoffmessung beruht auf der Reduktion von Sauerstoffmolekülen in einem polarisierten Stromkreis, bestehend aus einer Platinkathode und einer Silberanode. Die angelegte Polarisationsspannung liegt bei -0,65V. Die Clark-Elektrode besitzt eine Sauerstoff-permeable Membran, die die elektrochemische Zelle von dem unverfälschten, unveränderten Messgut trennt. Ausgewertet wird die Stromstärke, die proportional zur Sauerstoffkonzentration im Elektrolyten ist. Diese Messmethode stellte die Grundlage für implantierbare Sauerstoffsensoren dar (Wang 2004).

Eine Alternative zur polarographischen Messmethode ist die Winkler-Methode, bei der der Sauerstoffgehalt titrimetrisch bestimmt wird. Bei diesem Messverfahren wird Iodid in Anwesenheit von gelöstem Sauerstoff zu Iod umgewandelt. Die Menge des entstehenden Iods wiederum wird durch Titration mit Thiosulfat bestimmt und ist äquivalent zum ursprünglich vorhandenen Sauerstoff (Kuang 2007).

Beide Verfahren der Sauerstoffbestimmung sind ungeeignet für eine kontinuierliche Aufzeichnung in Zellträgern, da bei diesen Verfahren der Sauerstoff während der Messung irreversibel verbraucht wird (Bacon 1987, Kuang 2007).

Eine modernere Methode zur Sauerstoffmessung stellen optische Sensoren dar. Die Messmethode basiert auf der Lumineszenzstrahlung eines Leucht-/Indikatorstoffes (Luminophor), beispielsweise angeregt



durch eine blaue LED. Die physikalische Erscheinung der Lumineszenz ist die Eigenschaft bestimmter Materialien Licht auszusenden, das nicht durch Wärme, sondern durch eine andere Art der Anregung hervorgerufen wird. Elektronen eines Luminophors gelangen bei Anregung durch Licht aus einem energetischen Grundzustand in ein höheres Energieniveau. Dieses höhere Niveau wird wieder verlassen, wobei die Energiedifferenz in Form einer Strahlung emittiert wird. Bei Anwesenheit von Sauerstoffmolekülen, sind diese fähig, Energie der Elektronen in höheren Energieniveaus aufzunehmen und deren Übergang ins Grundniveau ohne die Emission von Strahlung zu ermöglichen. Der Sauerstoff wird dabei selbst von seinem Grundzustand in den angeregten Singulett-Sauerstoff umgewandelt. Mit steigender Konzentration des Sauerstoffs kommt es folglich zu einer Verringerung der Intensität der Lumineszenzstrahlung. Zusätzlich führt eine höhere Sauerstoffkonzentration zu mehr Kontaktreaktionen zwischen Sauerstoffmolekülen und Luminophorelektronen, was dazu führt, dass die Elektronen das höhere Energieniveau schneller verlassen. Bei geeigneter Wahl des Leuchtstoffes (Luminophore) und Wellenlänge des anregenden Lichts, ist daher sowohl Intensität als auch das zeitliche Abklingverhalten der Lumineszenzstrahlung abhängig von der Sauerstoffkonzentration (PreSens 2007).

Mit diesem Verfahren ist es möglich eine exakte und kontinuierliche Messung online durchzuführen mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung.

## 2.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es die komplexen Zusammenhänge zwischen Kulturbedingungen, Sauerstoffgehalt und Knorpelaufbau tiefgreifender zu erforschen, um im Ergebnis die Kulturbedingungen für tissue-engineertes Gewebe weiter zu optimieren.

Dazu wurde der Sauerstoffgehalt zu verschiedenen Kultivierungsstadien innerhalb Polyurethan-Konstrukten erfasst, die im Vorfeld mit humanen Chondrozyten beimpft wurden. Diese Messungen erfolgten mit

Glasfasermikrosensoren der Firma PreSens, die über das Prinzip der Lumineszenzlöschung eine kontinuierliche und exakte Sauerstoffbestimmung mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung erlauben.

In Anlehnung an Vorarbeiten der Forschungsgruppe AG Tissue Engineering, Klinikum rechts der Isar zur Messung von Sauerstoff an nativen Knorpelbiopsien mit ähnlicher Messvorrichtung, war es von besonderem Interesse, wie sich der Sauerstoffgehalt in Konstrukten mit längerer Kultivierungsdauer (51-70 Tage) verhält. Auf diese Gruppe der PU-Konstrukte wurde besonderes Augenmerk gelegt.

Zusätzlich stellte sich die Frage nach Unterschieden bezüglich der Vitalität der Chondrozyten in den verschiedenen Kultivierungsstadien, was mittels Lebend-/ Totfärbung im Anschluss an die Sauerstoffmessungen untersucht wurde.

Weitere biochemische Analysen sollten zeigen, ob sich Zusammenhänge erkennen lassen zwischen Kultivierungsstadium und Gehalt der Matrix an Glykosaminoglykanen, bzw. zwischen Kultivierungsstadium und Gesamtzellzahl.

### 3 Material und Methoden

#### Abkürzungen:

A/A Antibiotic/Antimycotic

DMEM Dulbecco´s modified eagle´s medium

DMMB 1,9-Dimethylmethylenblau

DNA Desoxyribonucleinsäure

FDA Fluoresceindiacetat

FKS Fötales Kälberserum

GAG Glykosaminoglykan

PBS Phosphatgepufferte Salzlösung

PI Propidiumiodid

TEN Tris, EDTA-Natrium, Natriumchlorid

#### Reagenzien:

Vitamin C (A4403, 100mg, Sigma, Steinheim, D)

Kollagenase NB4 (17454, 1 g, Serva, Heidelberg, D)

Kollagenase-Puffer (hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar:  
Hepes (Merck 1.10110) 47,6g, NaCl Ph.Eur. 14,0g, KCl Ph.Eur. 7,2g,  
CaCl<sub>2</sub>-Dihydrat 0,3g, Glukose-Monohydrat Ph.Eur. 1,98g, Aqua dest. ad  
2000ml)

PBS Dulbecco (L1825, 500ml, Biochrom AG, Berlin, D)

Trypsin/EDTA Lsg. (L2143, 100 ml, Biochrom AG, Berlin, D)

Trypanblau Lsg. 0,4% (T1854, 100 ml, Sigma, Steinheim, D)

DMEM (Dulbecco´s modified eagle´s medium, D5796, 500 ml, Sigma,  
Steinheim, D)

Insulin (I9278, 5 ml, Sigma, Steinheim, D)

Prolin (non animal source, P5607, 25 g, Sigma, Steinheim, D)

A/A (Antibiotic/Antimycotic, 15240.062, 100 ml, Invitrogen GmbH,  
Darmstadt, D)

FKS (Fötales Kälberserum, 10270-106, 500 ml, Invitrogen GmbH, Darmstadt, D)

Poly(caprolacton)diol, Mn=1250 (Aldrich, Taufkirchen, D)

Poly(caprolacton)triol, Mn=900 (Aldrich, Taufkirchen, D)

Isophoron-Diisocyanat 98% (Aldrich, Taufkirchen, D)

DABCO 3042 (Air Products, Norderstedt, D)

Dextrose (ACS reagent, Aldrich, Taufkirchen, D)

Methylal 99,5+% (Acros, Geel, BE)

1, 8-Diazabicycloundecene 98% (Acros, Geel, BE)

Fibrinogen (F4753, Sigma, Steinheim, D)

Trasylol 0,5 (PZN: 4032037, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, D)

Thrombin (PZN: 3419656, 500 Units aus Tissucol Duo S1 Immuno, Baxter, Unterschleißheim, D)

Thrombinpuffer (hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar: sterile 20mM Calciumchloridlösung)

Propidiumiodid (P4170, 100mg, Sigma, Steinheim, D)

Fluoresceindiacetat (F7378, 25 g, Sigma, Steinheim, D)

Ethanol 70% (hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar, 1l)

Aqua dest. (hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar, 5l)

Papain (45,2 mgP/ml, 3126, Worthington, Lakewood, NJ 08701, USA)

PBE-Puffer-Lösung (hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar: 6,00 g di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat, 1,46 g EDTA-Natrium (Titriplex III Merck 8421), Aqua dest. ad 500 ml)

L-Cystein (non animal source, C7352, 25g, Sigma, Steinheim, D)

DMMB-Lösung (hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar: 3,04g Glycin Merck p.A., 2,37 g Natriumchlorid Ph. Eur., 16 mg DMMB Aldrich 341088, Aqua dest, ad 1000ml)

Chondroitinsulfat-Lösung (hausinterne Apotheke Klinikum Rechts der Isar: 200 µl Chondroitin-Sulfat-Stocklösung (50 mg Chondroitinsulfat Sigma C9819 in 1ml Cystein/PBE-Puffer sterilfiltriert), 50 ml Cystein/PBE-Puffer (105 mg Cystein Merck 1.02838 in 60 ml PBE-Pufferlösung sterilfiltriert))

Hoechst-Farbstoff 33258 (861405, 100 mg, Sigma, Steinheim, D)  
TEN-Puffer (8,7660 g Natriumchlorid Ph.Eur.0,3720 g Titriplex III Merck  
8421 (Natrium-EDTA), 1,2115 g Trometamol Caelo 2709 (Tris), Aqua  
dest. ad 1000ml)  
Kalbsthymus-DNA (Sigma, Steinheim, D)

Material:

Mikroskop (Carl Zeiss, Jena, D)  
Axio Cam (MRc 5, Carl Zeiss, Jena, D)  
Digitalkamera (Canon, EOS 450D)  
96-Well-Mikrotiterplatte, transparent (costar 3599, Corning Inc., New  
York, USA),  
96-Well-Mikrotiterplatte, schwarz (Nunc A/S, Roskilde, DK)  
Photometer (Chameleon V Multilabelreader HX 425-157, Deelux  
Labortechnik, FIN)  
4-Kanal-Sauerstoffmessgerät (Oxy-4-micro, PreSens Precision Sensing  
GmbH, Regensburg, D)  
Glasfasermikrosensoren (NFSG-PST1-L2.5-TF-NS40-0.4-YOP, PreSens  
Precision Sensing GmbH, Regensburg, D)  
Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA)  
Wasserbad (Schüttelwasserbad, 1083, GFL, Burgwedel, D)  
Polypropylen-Zellkulturflaschen (Nunc A/S, Roskilde, DK)  
Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (Nunc A/S, Roskilde, DK)  
Eppendorfhütchen (Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf, D)  
Zentrifuge (Universal 30 RF, Hettich Zentrifugen, Adelsried, D)  
Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135 TV, Carl Zeiss, Jena, D)  
Brutschrank (Autoflow, CO2 Water-Jacketed Incubator, NuAire,  
Plymouth, USA)  
Feinwaage (Sartorius 1264 MP, Göttingen, D)

### 3.1 Knorpelgewebe

Für diese Arbeit wurden Chondrozyten aus humanem, hyalinem Knorpel isoliert. Die Knorpelpräparate wurden unter sterilen Bedingungen während Routineoperationen aus der Nase gewonnen. Es handelt sich dabei um Material, das im Laufe der Operationen nicht mehr benötigt wurde.

Die Patienten waren zwischen 8 und 40 Jahre alt, womit eine bereits vorhandene Altersdegeneration der Chondrozyten weitgehend ausgeschlossen werden konnte.

Die Knorpelpräparate wurden bis zur Zellisolierung in Vollmedium (30 ml DMEM, dem 10% FKS und 2,5% A/A zugefügt wurde) bei 8°C aufbewahrt. Jede weitere Handhabung der Chondrozyten erfolgte unter sterilen Bedingungen in der Laminar-Flow-Werkbank.

### 3.2 Trägermaterial

Als Zellträgermaterial dienten Polyurethanschäume der Firma Polymaterials AG, 87600 Kaufbeuren. Zur Herstellung dieser Schäume wurden 5 g Poly(caprolacton)diol, 4 g Poly(capro)triol, 90 µl DABCO 3042, 0,2g Dextrose, 1 g Methylal und 80 µl Diazabicycloundecene vermischt und in eine Kammer einer Zweikammerpumpe überführt. Die zweite Kammer wurde mit einer Mischung aus 2,15 g Isophoron-Diisocyanat und 0,5 g Methylal befüllt. Beide Kammern wurden auf 37°C erwärmt und die Komponenten langsam in eine auf 67°C vorgewärmte Form injiziert. Anschließend wurde der Schaum zwei Stunden bei 67°C ausgehärtet und eine Stunde in heißem, destillierten Wasser ausgekocht, um an der Oberfläche anhaftende Substanzen, wie beispielsweise DABCO 3042, zu entfernen. Danach wurden die entstandenen Konstrukte 24 Stunden im Vakuum getrocknet. Das Resultat war ein offenporiger Schaum mit einem Porendurchmesser von circa 200 µm, dessen Aussehen exakt der ausgewählten Form entsprach, wie beispielsweise Abb.2 zeigt.



Abb. 2 Polyurethan-Gerüst in Form eines Ohrs

Im Labor wurde der Schaum für die weiteren Versuche in kleine runde, 2 mm dicke Scheiben mit einem Durchmesser von 5 mm gestanzt (Abb.3, Abb.4). Diese wurden mit Ethanol 70% befeuchtet, in PBS gewaschen und schließlich bei 121°C, 20 min, bei 2150 mbar sterilisiert.



Abb. 3 Polyurethankonstrukt, 5mm Durchmesser

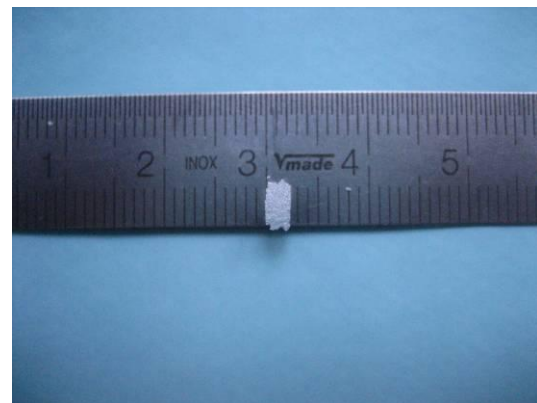


Abb. 4 Polyurethankonstrukt, 2mm dick

### 3.3 Zellkulturtechniken

#### 3.3.1 Gewebeverdau

In einer Petrischale wurde die Knorpelbiopsie mit einem Skalpell von Blut und Geweberesten befreit, mit PBS-Puffer gewaschen und in circa 1mm<sup>3</sup> Stücke zerteilt, um die Oberfläche zu vergrößern. Der zerkleinerte Knorpel wurde in eine Polypropylen-Zellkulturflasche gegeben, gewogen und dem Gewicht entsprechend mit 3ml/g Knorpel einer 2mg/ml Kollagenase-

Lösung versetzt. Dieser Ansatz wurde dann für 8h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. In ein Polypropylen-Zentrifugenröhrchen überführt, wurde der Verdau für 10 min. bei Raumtemperatur und 2000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in frischem Vollmedium mit einer Pasteurpipette resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt, auf Vitalität geprüft und als Monolayer-Kultur in Polypropylen-Zellkulturflaschen ausgebracht.

### 3.3.2 Bestimmung der Zellzahl / Vitalität

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde die Trypanblaumethode verwendet. Eine 0,4%ige Trypanblaulösung kann in beschädigte oder avitale Zellen eindringen und diese anfärben. Vitale Zellen färben sich nicht an und sind somit von avitalen Zellen zu unterscheiden. Trypanblau und Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1 gemischt und in einer Zählkammer des Rauminhalts 1 µl gegeben (Abb.5). Mittels eines Kontrastiermikroskops wurde anschließend durch Auszählen von neun Feldern die Lebendzellzahl bestimmt.

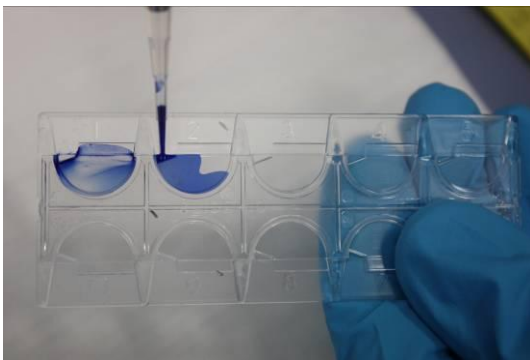


Abb. 5 Befüllen der Zählkammer  
(Trypanblau + Zellen)

### 3.3.3 Monolayerkultur

Die isolierten Zellen aus dem Gewebeverdau wurden in einer Dichte von 13000 Zellen/cm<sup>2</sup> in Polypropylen-Zellkulturflaschen ausgesät und im Brutschrank unter Normbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) kultiviert. Als



Kulturmedium kam DMEM mit 10 % FKS und 2,5% A/A zum Einsatz, welches alle drei bis vier Tage gewechselt wurde.

Kurz vor Erreichen eines konfluenten Zellrasens - nach circa 1-2 Wochen in Kultur - wurde das Medium abgesaugt, die Zellkulturflasche zweimal mit PBS gespült und die Zellen nach Zugabe von 2 ml Trypsin vom Untergrund der Zellkulturflasche abgelöst. Die enzymatische Wirkung des Trypsins wurde durch Zugabe von 5 ml DMEM antagonisiert, nachdem unter mikroskopischer Sichtkontrolle (Kontrastiermikroskop) die Ablösung der Zellen beobachtet werden konnte. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein Polypropylen-Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 2000 U/min und 37°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in frischem Vollmedium resuspendiert und die Lebendzellzahl wiederholt mit der Trypanblaumethode bestimmt. Zur Erhöhung der Zellausbeute wurden dann die Zellen wiederum in einer Konzentration von 13000/cm<sup>2</sup> auf zwei bis drei neue Kulturflaschen aufgeteilt, die Zellen also passagiert.

Es wurden 2-3 Passagen durchgeführt und die Zellen für etwa 2-3 Wochen kultiviert.

### 3.4 Besiedelung der Polyurethan-Zellträger

#### 3.4.1 Zellkleberherstellung

Um die Zellen dauerhaft dreidimensional in einem Polyurethankonstrukt zu halten wurde ein Zellkleber hergestellt.

Die Zellkleberherstellung wurde in Vorversuchen der Forschungsgruppe AG Tissue Engineering, Klinikum rechts der Isar, optimiert. Konzentriertes Fibrinogen als Kleberproteinlösung und eine Thrombinlösung mit verschiedenen Stabilisatoren (Faktor IV, Faktor VIII, Fibrinolyseinhibitor Aprotinin) bildeten die biochemische Basis. Für Untersuchungen zu Stabilität, Formbeständigkeit, Degradation und Resorption wurden aus einem Fibrin-Chondrozyten-Gemisch anfänglich kleine Quader hergestellt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen dienten zur Optimierung der

Verdünnung der Einzelkomponenten und der eingesetzten Ausgangszellzahl (Staudenmaier 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde das optimierte Ergebnis verwendet.

Dazu wurden bei Raumtemperatur 5 g Fibrinogen in 50 ml TrasyloI gelöst. Das entstandene Fibrinogen wurde in Aliquots zu 1-2 ml abgefüllt und bei -20°C im Gefrierschrank gelagert. 1 ml Thrombin wurde bei Raumtemperatur in 100 ml Thrombinpuffer gelöst, ebenfalls in Aliquots zu 1-2 ml abgefüllt und bei -20°C im Gefrierschrank gelagert. Kurz vor der Verarbeitung wurde die benötigte Menge an Thrombin und Fibrin bei Raumtemperatur aufgetaut. Die beiden Komponenten im Verhältnis 1:1 vermischt, ergaben nach einigen Minuten eine auspolymerisierte Fibrin-Thrombin-Matrix.

#### 3.4.2 Besiedelung der Polyurethanzellträger

Nach der Amplifikation der Knorpelzellen in Kultur, wurden die vorbereiteten Polyurethankonstrukte mit 1 Million Zellen besiedelt. Dazu wurde das Medium aus einer Zellkulturflasche abgezogen und, um es vollständig zu entfernen, mit PBS nachgespült. Es wurden 2 ml Trypsin zugesetzt und die Kulturflasche für 3-5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Unter mikroskopischer Sichtkontrolle (Kontrastiermikroskop) wurde das Ablösen der Knorpelzellen vom Kulturflaschenboden beobachtet und die Wirkung des Trypsins anschließend mit 5 ml DMEM antagonisiert. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 2000 U/min, 10 min und 37°C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 1 ml DMEM resuspendiert und die Zellzahl mittels Trypanblaumethode bestimmt. Nach Zellzahlbestimmung wurde erneut zentrifugiert, um das überstehende Medium komplett zu entfernen.

Nun erfolgte das Resuspendieren des Pellet in der Thrombin-Komponente. Das Zellpellet wurde dazu in der entsprechenden Menge Thrombin-Lösung suspendiert, so dass eine Konzentration von 50000 Zellen/ $\mu$ l entstand. Danach sind immer 20  $\mu$ l dieser Zell-Thrombin-Suspension mit 20  $\mu$ l Fibrinogen-Lösung vermengt worden, wodurch sich eine Endkonzentration

von 25000 Zellen/ $\mu\text{l}$  bildete und die, für einen Zellträger nötige Menge von 40  $\mu\text{l}$  entstand. Ein Polyurethanzellträger nimmt 40  $\mu\text{l}$  auf und somit in dieser Konzentration genau 1 Million Zellen. Diese Mischung wurde mit der Pipette an verschiedenen Stellen des Zellträgers eingebracht. Durch die Vorbehandlung des Zellträgers mit Ethanol und die dadurch verbesserten hydrophilen Eigenschaften, wurde der Zellkleber vollständig durch Kapillarwirkung aufgenommen.

Nach der Besiedelung wurden die Konstrukte noch für circa 30 min. bis zur vollständigen Polymerisation im Brutschrank aufbewahrt. Danach in Zellkulturflaschen überführt und mit DMEM bedeckt, dem 10% FKS, 2,5% A/A, 0,2% Insulin, 0,4% Prolin und 0,5% Vitamin C zugesetzt wurden. Das Medium wurde alle 3-4 Tage erneuert. Die Konstrukte wurden so lange im Brutschrank kultiviert, bis diese für die Sauerstoffmessungen im Konstruktinneren weiterverwendet wurden.

### 3.5 In Vitro-Messung des Sauerstoffgehalts im Konstruktinneren

#### 3.5.1 Messsonde

Zur Messung des O<sub>2</sub>-Gehalts im Konstrukt wurde ein 4-Kanal-Messgerät (Abb.7) mit Glasfaser-Mikrosensoren (Abb.8) des Durchmessers 140  $\mu\text{m}$  benutzt. Die Glasfaser ist zum Schutz und um ausreichende Stabilität beim Applizieren in das Knorpel-Konstrukt zu gewähren, von einer 400  $\mu\text{m}$  dünnen Edelstahladel umhüllt.

Durch die geringe Dicke der Edelstahladel und der Glasfaser ist sowohl eine mikro-invasive Messung möglich, als auch eine Messung von hoher räumlicher Auflösung.

Über das Prinzip der Lumineszenzlöschung erfassen die Glasfaser-Mikrosensoren die Sauerstoffkonzentrationen im Konstrukt. Dabei beleuchtet das Messgerät die Indikatorbeschichtung des Sensors. Bei Anwesenheit von Sauerstoffmolekülen kollidieren diese mit den Molekülen der Indikatorschicht, wodurch ein Energietransfer in Richtung der Sauerstoffmoleküle stattfindet und das Lumineszenzsignal der

Indikatorschicht abnimmt (Abb.6). Die fluoreszierende optische Emission des Indikatorstoffs sinkt folglich analog der Menge der vorhandenen Sauerstoffmoleküle im gemessenen Konstrukt ab. Diese Technik misst die Intensitätsabnahme der Emission und die Lumineszenzabklingzeit und ermöglicht eine zuverlässige und exakte Sauerstoffbestimmung.

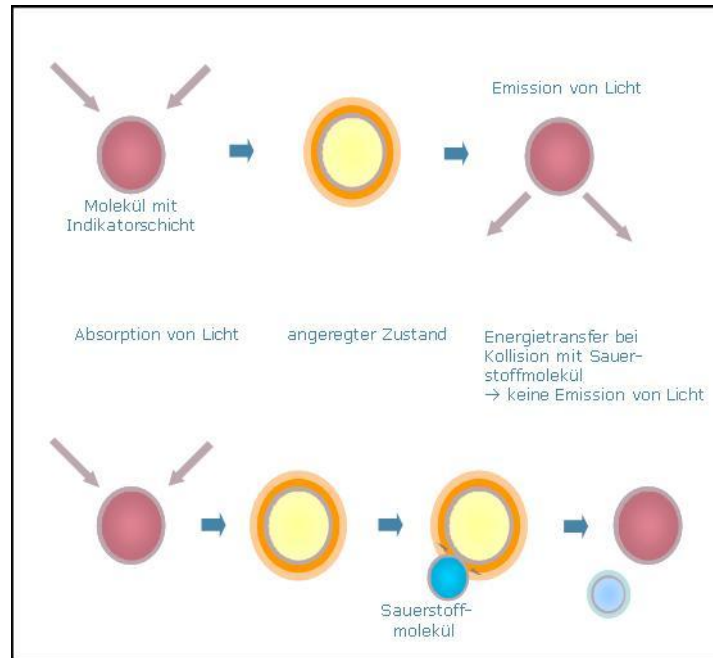


Abb. 6 Schematische Darstellung der Lumineszenzlöschung, modifiziert nach PreSens

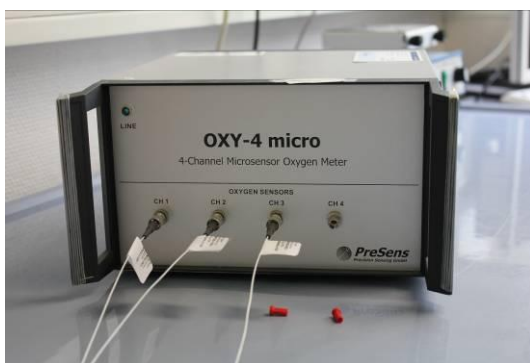


Abb. 7 4-Kanal-Messgerät



Abb. 8 Glasfaser-Mikrosensor

Die Kalibrierung der Glasfaser-Mikrosensoren erfolgte durch eine 2-Punkt-Kalibrierung in O<sub>2</sub>-freier Umgebung mit Stickstoff und in wassergesättigter Luft.

### 3.5.2 Versuchsaufbau

Um die Chondrozyten während der Messung nicht zu viel Stress zu unterziehen, wurden die Messungen stets im Brutschrank unter definierten Bedingungen - 5% CO<sub>2</sub>, 37°C - durchgeführt. Das Medium, bestehend aus DMEM mit 10% FKS und 2,5% A/A, wurde auf 37°C in einem 50 ml Polypropylen-Zentrifugenröhrchen vorgewärmt.

Nach der Entnahme eines Konstrukts aus der Kultur, unter sterilen Bedingungen der Laminar Flow, wurde vorsichtig die Glasfaser-Messsonde über Sichtkontrolle möglichst genau mittig im Konstrukt platziert. Die Messsonde wurde zusammen mit dem Konstrukt danach in das vorgewärmte Zentrifugenröhrchen im Brutschrank überführt und dieses zur Hälfte mit Parafilm verschlossen (Abb.9). Die Messung konnte anschließend gestartet werden und es wurde alle 60 Sekunden der Sauerstoffgehalt im Konstruktinneren aufgezeichnet. Die Messungen wurden beendet, wenn sich die Sauerstoffkonzentration auf einen konstanten Wert (Plateau) eingependelt hatte oder die Messdauer 60 Minuten überschritten hat (Abb.10).



Abb. 9 Versuchsaufbau mit drei PU-Konstrukten zur Sauerstoffmessung

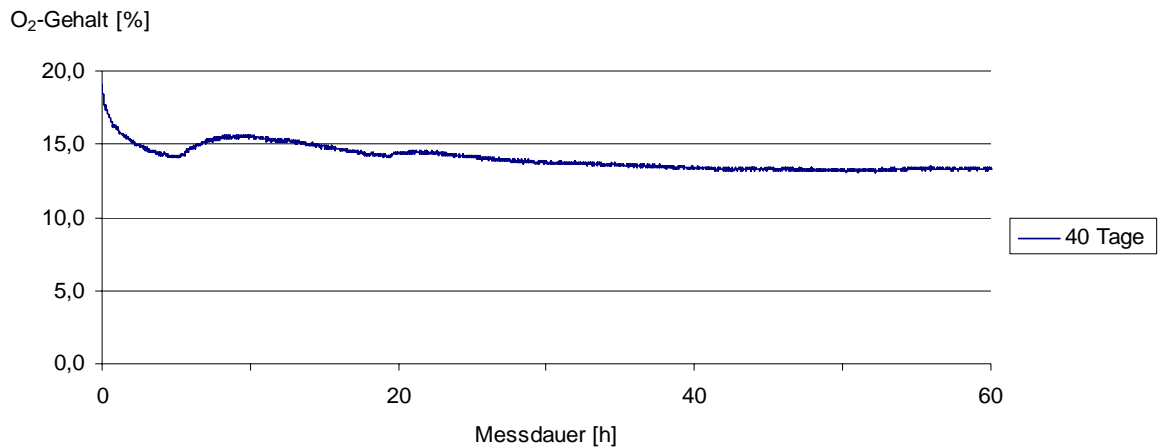


Abb. 10 Beispielgraph des Sauerstoffgehalts eines PU-Konstrukts mit 40 Tagen Vorkultivierung; konstantes Plateau von 13,3% O<sub>2</sub> erreicht nach ~40 h, Ende der Messung nach 60h

### 3.5.3 Versuchsgruppen

Die Messungen der einzelnen Konstrukte erfolgte in Abhängigkeit zur Kultivierungsdauer (Abb.11), wobei die erste Messung immer erst nach 6 Tagen Vorkultivierung, also ab Tag 7, gestartet wurde, um den Konstrukten Zeit zur Erholung und die Möglichkeit zur Anhaftung am Polyurethanschaum zu geben.

Kultivierungszeit [d]	7-20	21-35	36-50	51-70	51-70	
Messreihe	A	B	C	D1	D2	
Konstruktanzahl (n)	14	15	19	15	16	n=79 (gesamt)
	Bestimmung des Sauerstoffgehalts					
	Bestimmung des Nassgewichts					
	Bestimmung der Vitalität					
	Bestimmung des DNA-Gehalts/Zellzahl und des Gehalts an Glykosaminoglykanen					

Abb. 11 Aufteilung und Anzahl (n) der Konstrukte in den verschiedenen Versuchsgruppen/ Messreihen und durchgeführte Analysen

### 3.6 Bestimmung des Nassgewichts

Nach Beendigung der Sauerstoffmessungen wurden die Konstrukte mit Kompressen von eventuell anhaftendem Medium befreit und mit einer

handelsüblichen Feinwaage gewogen. Danach wurden sie mit einem Skalpell halbiert und erneut gewogen, eine Hälfte für die späteren biochemischen Verfahren bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren, die andere Hälfte direkt im Anschluss für die Lebend-/ Totfärbung verwendet.

### 3.7 Lebend-/ Totfärbung mittels Fluoreszenz

Die Vitalität der Konstrukte wurde durch Doppelfärbung mit Fluoresceindiacetat und Propidiumiodid bestimmt.

Bei diesem Verfahren ist es möglich durch den gleichzeitigen Einsatz zweier Fluoreszenzfarbstoffe lebende und tote Zellen differenziert anzufärben.

Die lebenden Zellen werden durch Fluoresceindiacetat (FDA) spezifisch angefärbt. FDA wird in die Zellen aufgenommen und dort von Esterasen durch Hydrolyse zu Fluorescein und Acetat aufgespaltet. Fluorescein kann die intakte Zellmembran nicht mehr passieren und wird somit in vitalen Zellen angereichert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop erscheint das Zytoplasma dieser Zellen in einer Grünfluoreszenz.

Tote, nekrotische Zellen wurden mit Propidiumiodid (PI) spezifisch angefärbt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Tatsache, dass PI nur durch Membrandefekte nekrotischer Zellen eindringen kann und sich dort an die DNA anlagert. Diese Zellkerne sind im Fluoreszenzmikroskop deutlich rot fluoreszierend zu erkennen.

Zur Bestimmung der Vitalität wurde die Hälfte eines Konstrukts nach der Sauerstoffmessung mit einem Gemisch der beiden Fluoreszenzfarbstoffe gefärbt. Dazu wurden  $500\ \mu\text{l}$  einer FDA-Lösung ( $25\text{mg/ml}$ ) und  $500\ \mu\text{l}$  einer PI-Lösung ( $1\text{mg/ml}$ ) zusammen in einem Becherglas mit  $60\ \text{ml}$  Aqua dest. vermischt und für  $10\ \text{min.}$  bei  $2000\ \text{U/min.}$  und Raumtemperatur zentrifugiert.

Das halbe Konstrukt wurde mit einem Skalpell sehr behutsam in so dünne Scheiben geschnitten wie möglich, welche dann mit der Färbelösung übergossen wurden. Nach einer Einwirkzeit von  $60\ \text{Sekunden}$  in einem abgedunkelten Raum, wurden die Konstruktteile der Lösung entnommen

und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Mittels einer Mikroskop-Digital-Kamera wurde ein Bild der Lebendfärbung (Abb.12) erstellt und anschließend ein Bild desselben Ausschnitts der Totfärbung (Abb.13). Durch das Computerprogramm Axio Vision Rel. 4.6 ließen sich beide Bilder fusionieren und einfärben, um die Auswertung zu erleichtern (Abb.14). Zur Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen wurden in dem Fusionsbild die lebenden und toten Zellen ausgezählt und die Vitalität mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{Vitalität} = \frac{\text{Anzahl der lebenden Zellen}}{\left( \text{Anzahl der lebenden Zellen} + \text{Anzahl der toten Zellen} \right)}$$

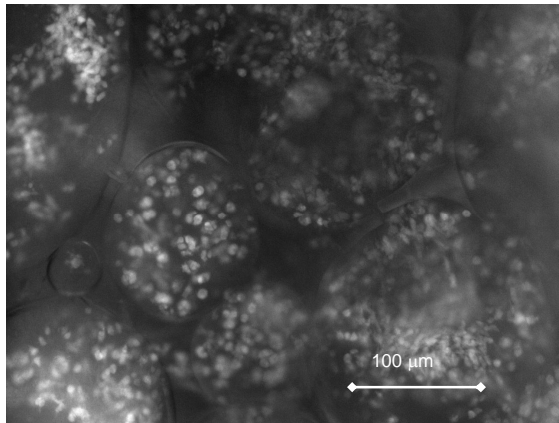


Abb. 12 Beispiel Lebendfärbung mit FDA

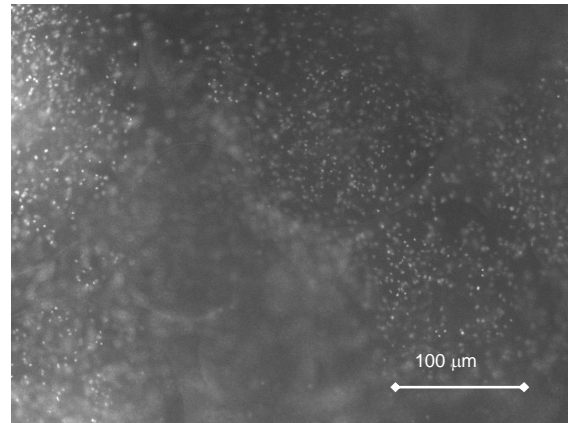


Abb. 13 Beispiel Totfärbung mit PI

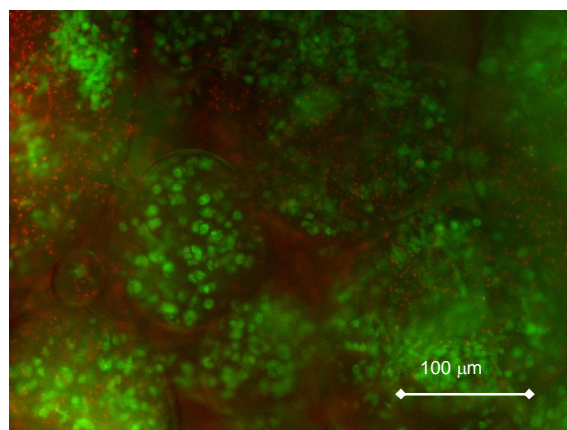


Abb. 14 Fusionsbild Lebend-/Totfärbung



### 3.8 Biochemische Verfahren

#### 3.8.1 Papainverdau

Um die biochemischen Analysen durchführen zu können, wurden die Polyurethan-Konstrukte mit Papainase verdaut. Dazu wurde mit einer PBE-Pufferlösung eine 0,01 molare Cystein-Lösung hergestellt, diese sterilfiltriert und darin 0,125 mg/ml Papain gelöst. Diese Verdauungslösung wurde immer sofort verbraucht. Die Konstrukt hälften wurden mit einer chirurgischen Schere in einem Eppendorfhütchen zerkleinert und mit je 1 ml der Verdauungslösung bei 60°C für 16 Stunden im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss erfolgten zügig die photometrischen und fluorimetrischen Analysen.

#### 3.8.2 Quantifizierung der Glykosaminoglykane (DMMB-Assay)

Dieser Assay ermittelt quantitativ den Gehalt an Glykosaminoglykanen, die eine entscheidende Komponente der extrazellulären Matrix des hyalinen Knorpels darstellen (Archer 2003). Die Glykosaminoglykane bilden mit 1,9-Dimethylmethyleneblau (DMMB) einen blauen Farbkomplex, dessen Absorption photometrisch messbar ist. Dazu wurde der Papainverdau mit einer DMMB-Lösung versetzt und in Anlehnung an Arbeiten von Farndale (Farndale 1986) photometrisch gegen eine Standardreihe aus einer Chondroitinsulfat-Lösung gemessen. Aus dieser Lösung wurde eine ansteigende Standardverdünnungsreihe der Konzentrationen 0 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 60 µg/ml, 80 µg/ml und 120 µg/ml hergestellt. 50 µl der Proben wurden mit 50 µl dest. Wasser verdünnt und mit 2 ml DMMB gemischt. Auch 100 µl der Standardverdünnung wurden mit 2 ml DMMB gemischt und sowohl davon als auch von den Proben jeweils 250 µl in die Vertiefungen einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert.

Die Auslesung der Mikrotiterplatte wurde mit einem computerunterstützten Photometer (Software: Mikrowin 2000) bei einer Wellenlänge von 523 nm durchgeführt. Die Extinktionen der

Standardverdünnungsreihe wurden doppelt, die Extinktionen der Proben dreifach bestimmt.

Die Messwerte wurden in eine Excel-Datei überführt und mit Erstellung einer Geradengleichung ausgewertet.

### 3.8.3 Bestimmung des DNA-Gehalts/Zellzahl (Hoechst-Assay)

In Anlehnung an Arbeiten von Kim und Mitarbeitern kann mit Hilfe des Farbstoffes Hoechst 33258 die Zellzahl eines Konstrukts indirekt, über die Messung der Gesamt-DNA, bestimmt werden. Der gesamte DNA-Gehalt eines Chondrozyten wurde wie von Kim beschrieben mit 7,7 pg veranschlagt (Kim 1988).

Der Bisbenzimidazolfarbstoff Hoechst 33258 wurde mit einer Konzentration von 1 mg/ml in einem TEN-Puffer gelöst. Diese Stock-Lösung wurde lichtgeschützt bei 8°C gelagert. Zur Erstellung einer Standardverdünnungsreihe wurde eine Kalbsthymus-DNA-Lösung mit der Konzentration 22 µg/ml verwendet. Hieraus wurden Verdünnungen von 0 µg/ml, 2,2 µg/ml, 4,4 µg/ml, 8,8 µg/ml und 11 µg/ml hergestellt. Des Weiteren wurde ein 10%iger TEN-Puffer durch Verdünnung mit dest. Wasser hergestellt.

Zur Durchführung der fluorimetrischen Messungen wurde aus der Stock-Lösung eine Gebrauchsverdünnung von 0,1 µg/ml in 10%igem TEN-Puffer hergestellt. 50 µl der Proben wurden mit 50 µl des 10%igen TEN-Puffers verdünnt und mit 2 ml der Farbstoffgebrauchsverdünnung gemischt. Auch 100 µl der Standardverdünnung wurden mit 2 ml Farbstoffgebrauchsverdünnung gemischt und sowohl davon als auch von den Proben jeweils 250 µl in die Vertiefungen einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert.

Die Messungen erfolgten durch ein computerunterstütztes Photometer (Software: Mikrowin 2000). Die fluorimetrische Messung fand bei einer Exzitationswellenlänge von 355 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm statt. Die Emissionen der Standardverdünnungsreihe wurden doppelt, die der Proben dreifach bestimmt. Die Messwerte wurden in eine

Excel-Datei überführt und mit Erstellung einer Geradengleichung ausgewertet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Knorpelisolierung und Monolayer-Kultur

Zur Beimpfung der PU-Konstrukte mussten die humanen Chondrozyten stark proliferiert werden. Dabei war die Zerkleinerung des aus Biopsien gewonnenen Knorpels sicher reproduzierbar durchzuführen. Die Patienten waren nicht älter als 40 Jahre, womit eine bereits vorhandene Altersdegeneration der Chondrozyten weitestgehend ausgeschlossen werden konnte.

Die Einzelzellen tolerierten die Isolierung gut, was anhand der Trypanblau-Methode gezeigt werden konnte.

In Monolayer-Kultur kam es zu räumlich homogener Proliferation, so dass der Boden der Zellkulturflaschen vollständig von Zellen bedeckt war. Nach 2-3 Passagen konnten ausreichend Zellen (~20-25 Millionen) für die Besiedelung der PU-Konstrukte gewonnen werden.

Nach wenigen Tagen in Monolayer-Kultur verloren die Chondrozyten ihre kugelige Gestalt und zeigten eine langgestreckte, spindelförmige Morphologie. Dieser als Dedifferenzierung bezeichnete Vorgang ist reversibel sobald die Chondrozyten in eine dreidimensionale Kultur eingesetzt werden, was mit der Beimpfung von PU-Konstrukten erreicht wurde.

### 4.2 3D-Kultur

Nach 3-4 Wochen in Monolayer-Kultur wurden die Chondrozyten auf PU-Konstrukte übertragen. Die Konstrukte konnten je 40µl Volumen aufnehmen, in dem 1 Million Zellen suspendiert wurden. Durch die Vorbehandlung der Zellträger mit Ethanol und die dadurch verbesserten hydrophilen Eigenschaften, wurde die Suspension vollständig durch Kapillarwirkung in das Konstrukt aufgenommen. Um die Zellen nicht zu großem Stress zu unterziehen und um ihnen genügend Zeit zum Anhaften

am Polyurethanschaum zu geben, wurden alle Versuche erst nach 6 Tagen gestartet.

#### 4.3 Messung des Sauerstoffgehalts

Der Sauerstoffgehalt in den einzelnen Konstrukten wurde 60 Stunden gemessen, wenn er sich nicht schon vorher auf einen konstanten Wert eingependelt hatte. Pro Minute wurde dabei ein Wert aufgezeichnet.

Insgesamt wurden 79 PU-Konstrukte untersucht, die in fünf Messreihen (A, B, C, D1, D2) mit unterschiedlicher Kultivierungszeit unterteilt wurden (Abb.15). PU-Konstrukte mit längerer Kultivierungsdauer waren von besonderem Interesse, weshalb zwei Messreihen (D1, D2) im Kultivierungszeitraum Tag 51-70 untersucht wurden.

Sofort nach Abschluss der Sauerstoffmessungen wurden die Konstrukte gewogen und deren Vitalität bestimmt. Danach folgten die biochemischen Analysen bezüglich der Zellzahl und des Gehalts an Glykosaminoglykanen.

Messreihen	A	B	C	D1	D2	
Kultivierungszeit [d]	7-20	21-35	36-50	51-70	51-70	
Konstruktanzahl (n)	14	15	19	15	16	n=79
Sauerstoffmessung und Vitalitätsbestimmung	14	15	19	15	16	n=79
Bestimmung des Nassgewichts	14	15	19	15	16	n=79
Biochemische Analysen (DNA-Gehalt; GAG-Gehalt)	12 (2 verloren)	15	19	15	16	n=77

Abb. 15 Unterteilung der Messreihen nach Kultivierungszeit; Anzahl(n) der PU-Konstrukte in den unterschiedlichen Analysen

Soweit nicht anders angegeben beziehen sich die folgenden Werte auf den Mittelwert ( $\pm$ Standardabweichung).

---

### Messreihe A

Messreihe A bildete die Startgruppe für die Sauerstoffmessungen an den sieben Tage zuvor beimpften PU-Konstrukten. Diese Gruppe beinhaltete 14 PU-Konstrukte, die zu unterschiedlichen Kultivierungszeiten (7-20 Tage) untersucht wurden (Abb.16, Abb.17).

Nach einem minimalem, initialen Anstieg des Sauerstoffgehalts nach dem Einbringen der Glasfaser-Mikrosensoren und dem Starten der Messung, zeigte sich ein kontinuierlicher Abfall der Sauerstoffkonzentration. Die durchschnittliche Konzentration zum Startzeitpunkt lag bei  $14,2(\pm 3,90)\%$ , nach 60 Stunden bei  $9,5(\pm 2,46)\%$ . Dies bedeutet einen Abfall von 33% vom Start zum Ende der Messung.

Gegen Ende der Messung - nach 53,4 Stunden - fiel der Sauerstoffgehalt unter  $10(\pm 2,48)\%$ . Nach 60 Stunden lagen die Werte zwischen 4,4% und 13,0% O<sub>2</sub>. 8 von 14 PU-Konstrukten wiesen am Endpunkt Werte unter 10 % O<sub>2</sub> auf.

Die Steigung(m) des Mittelwertgraphen (Abb.17) betrug  $-0,068$ , was einem Neigungswinkel von  $\alpha = -3,9^\circ$  entspricht.

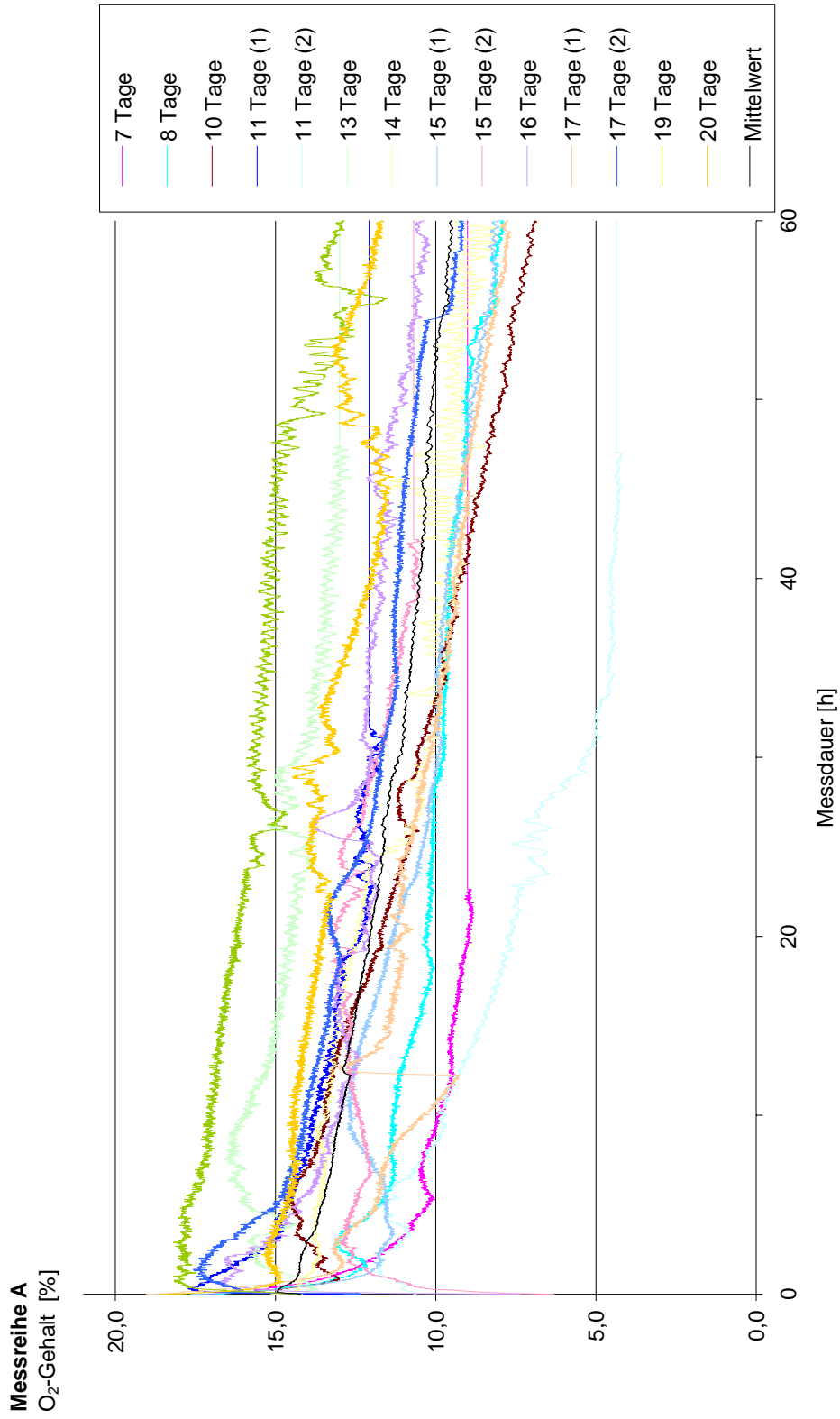


Abb. 16 Sauerstoffgraphen der Messreihe A  
Sauerstoffgraphen, ermittelt in unterschiedlichen Kultivierungsstadien der PU-Konstrukte (farbig) und Mittelwertgraph (schwarz)

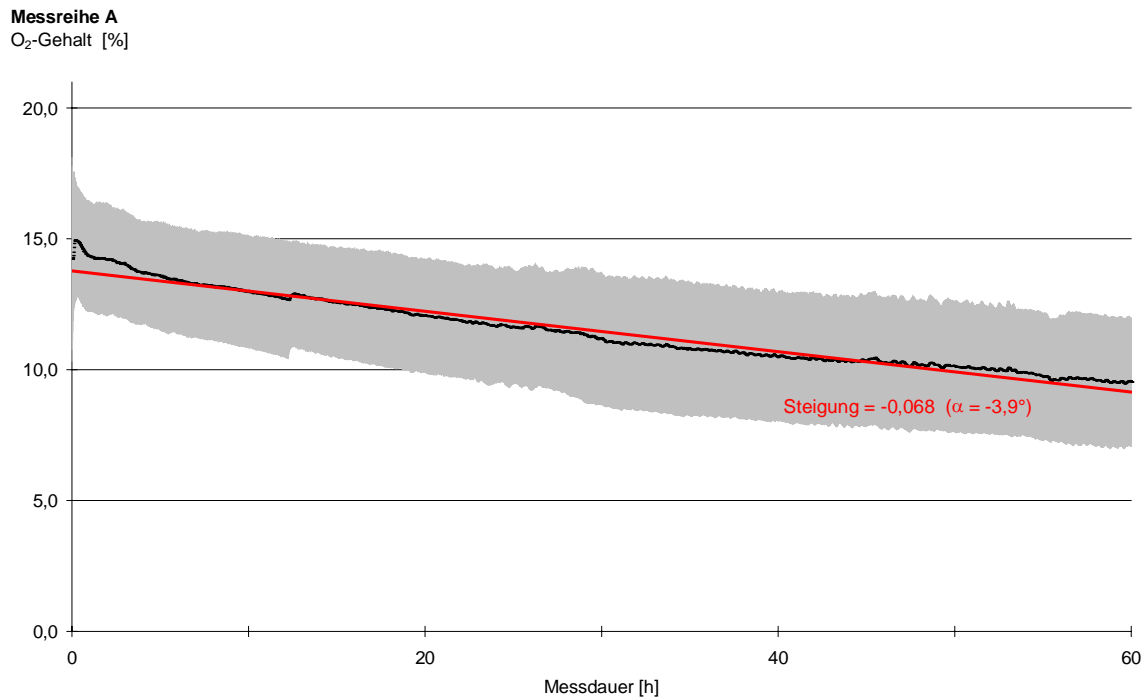


Abb.17 Mittelwertgraph plus Standardabweichung der Messreihe A

### Messreihe B

In Messreihe B wurde die Sauerstoffkonzentration in 15 PU-Konstrukten gemessen, die zuvor zwischen 21-35 Tagen kultiviert wurden (Abb.18, Abb.19).

Auch diese Gruppe wies einen anfänglichen Anstieg des O<sub>2</sub>-Gehalts nach dem Start der Messung auf, darauf folgte ein stetiger Abfall der Sauerstoffkonzentrationen.

Zum Startzeitpunkt lag der O<sub>2</sub>-Gehalt bei 14,7(±4,60)%, nach 60 Stunden bei 10,4(±4,28)%, ein Abfall um 29%. Im Gegensatz zu Messreihe A sank der durchschnittliche O<sub>2</sub>-Gehalt zum Ende nicht unter 10%. Nur 5 von 15 PU-Konstrukten lagen darunter.

Der Wert eines PU-Konstrukts des Kultivierungstags 26 fiel bereits nach 18,6 Stunden auf 0% O<sub>2</sub>, obwohl die Messgeräte einwandfrei funktionierten. Zur Kontrolle wurde die Glasfasersonde entfernt und der Luftsauerstoffgehalt damit korrekt mit 21% bestimmt.

Am Endpunkt der Messung lagen Werte zwischen 0% und 17,4% O<sub>2</sub> vor.



Die Steigung des Mittelwertgraphen (Abb.19) betrug  $-0,072$ , was einem Neigungswinkel von  $\alpha = -4,1^\circ$  entspricht.

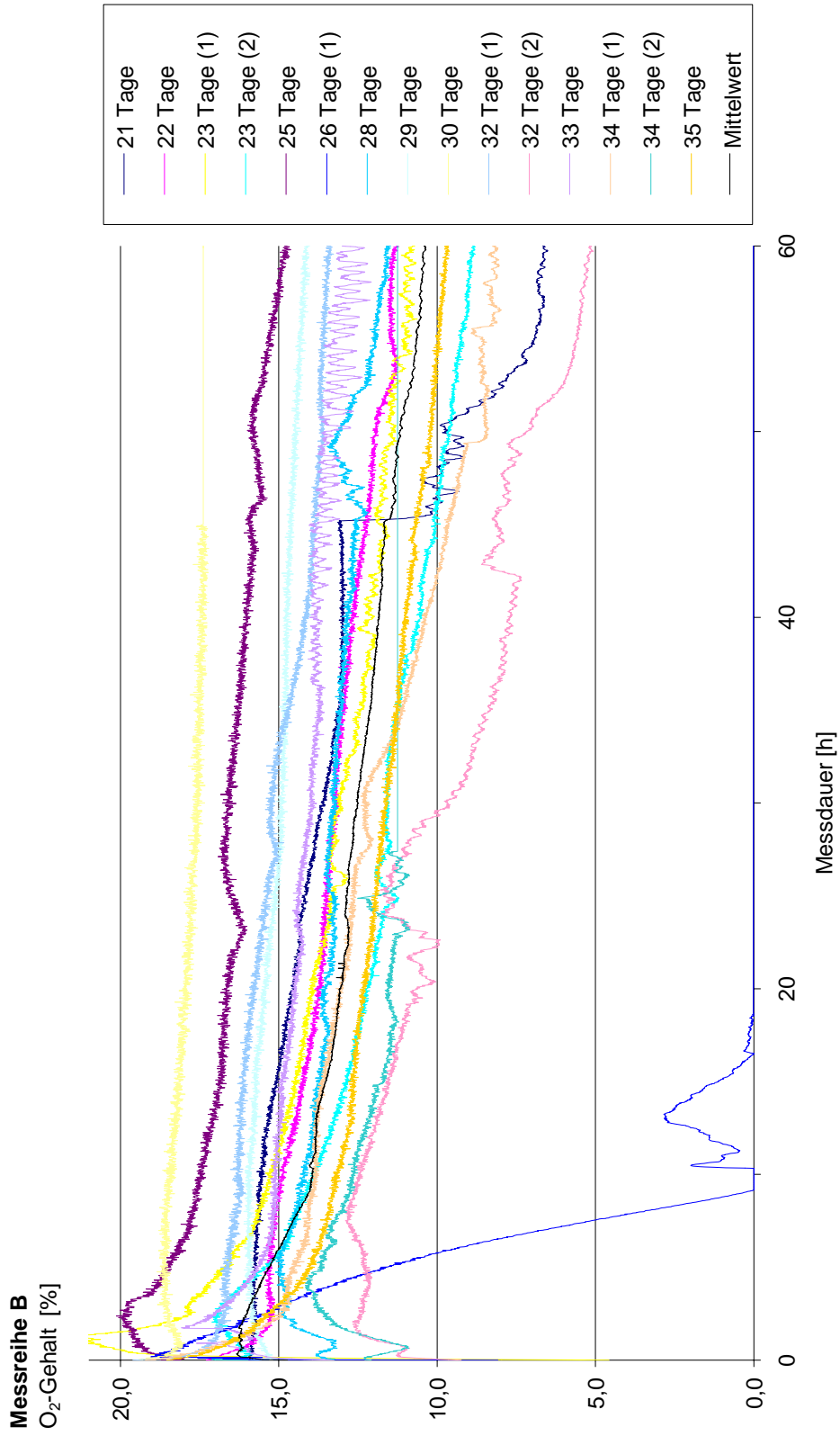


Abb. 18 Sauerstoffgraphen der Messreihe B  
Sauerstoffgraphen, ermittelt in unterschiedlichen Kultivierungsstadien der PU-Konstrukte (farbig) und Mittelwertgraph (schwarz)

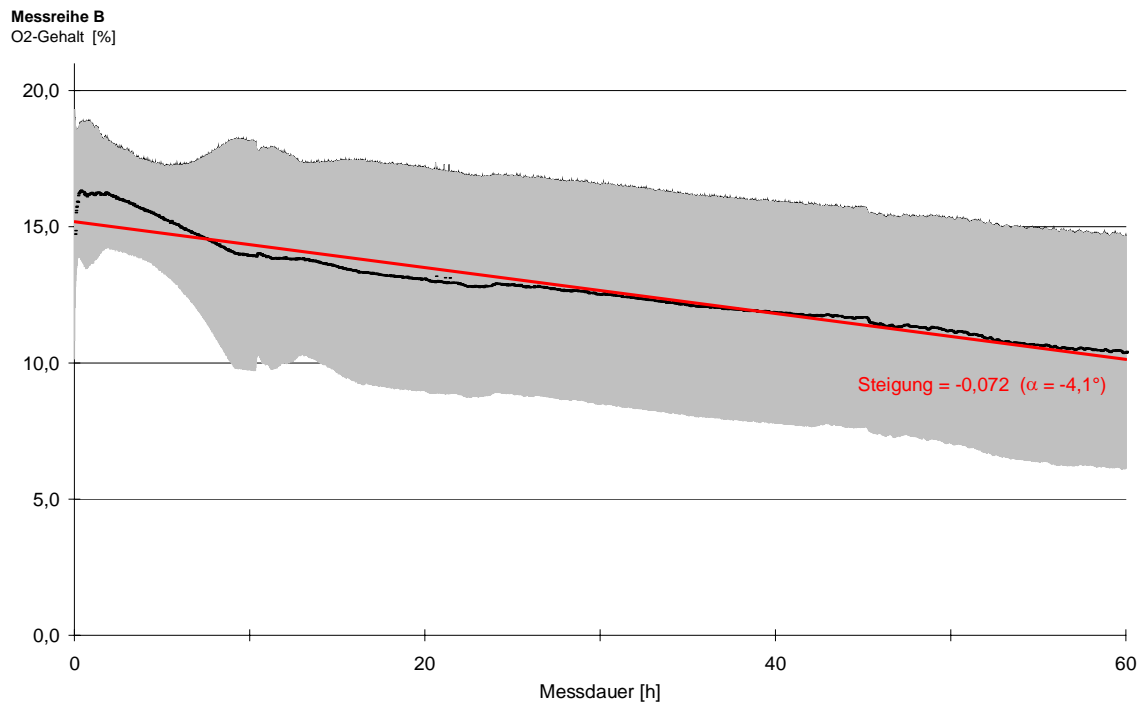


Abb.19 Mittelwertgraph plus Standardabweichung der Messreihe B

### Messreihe C

Messreihe C beinhaltet die Messergebnisse von 19 Konstrukten im Kultivierungszeitraum 36-50 Tage (Abb.20, Abb.21).

In dieser Messreihe zeigte sich im Gegensatz zu Gruppe A und B kein initialer Anstieg des O<sub>2</sub>-Gehalts. Einem anfänglich stärkeren Abfall folgte aber auch hier eine kontinuierliche Abnahme der Werte vom Messstart 16,2(±3,2)% bis Messende 9,5(±4,04)%. Insgesamt bedeutete dies eine Abnahme um 42%.

Nach 47,4 Stunden sank der Sauerstoffgehalt des Konstrukts mit dem Kultivierungsalter 50 Tage auf 0% O<sub>2</sub>. Eine Kontrolle der Messvorrichtung bestätigte auch hier ein einwandfreies Messergebnis.

Nach 51,8 Stunden lag der Mittelwert der Sauerstoffkurven unter 10% O<sub>2</sub>. Folglich 1,6 Stunden früher als in Messreihe A.

Am Ende der Messung nach 60 Stunden ergaben sich Sauerstoffkonzentrationen von 0% bis 13,6% O<sub>2</sub>, 8 von 19 Konstrukten hatten Endwerte unter 10%.

---

Der durchschnittliche O<sub>2</sub>-Gehalt nach 20, 40 und 60 Stunden in Gruppe C lag unter den Werten der Messreihen A und B (Abb.22).

Auffällig in Messreihe C waren die Messkurven von 3 Konstrukten (Tag 47(2), Tag 50(2), Tag 50(4)), die starke Schwankungen aufwiesen (Abb.20).

Die Steigung(m) des Mittelwertgraphen (Abb.21) betrug  $-0,057$ , was einem Neigungswinkel von  $\alpha = -3,3^\circ$  entspricht.

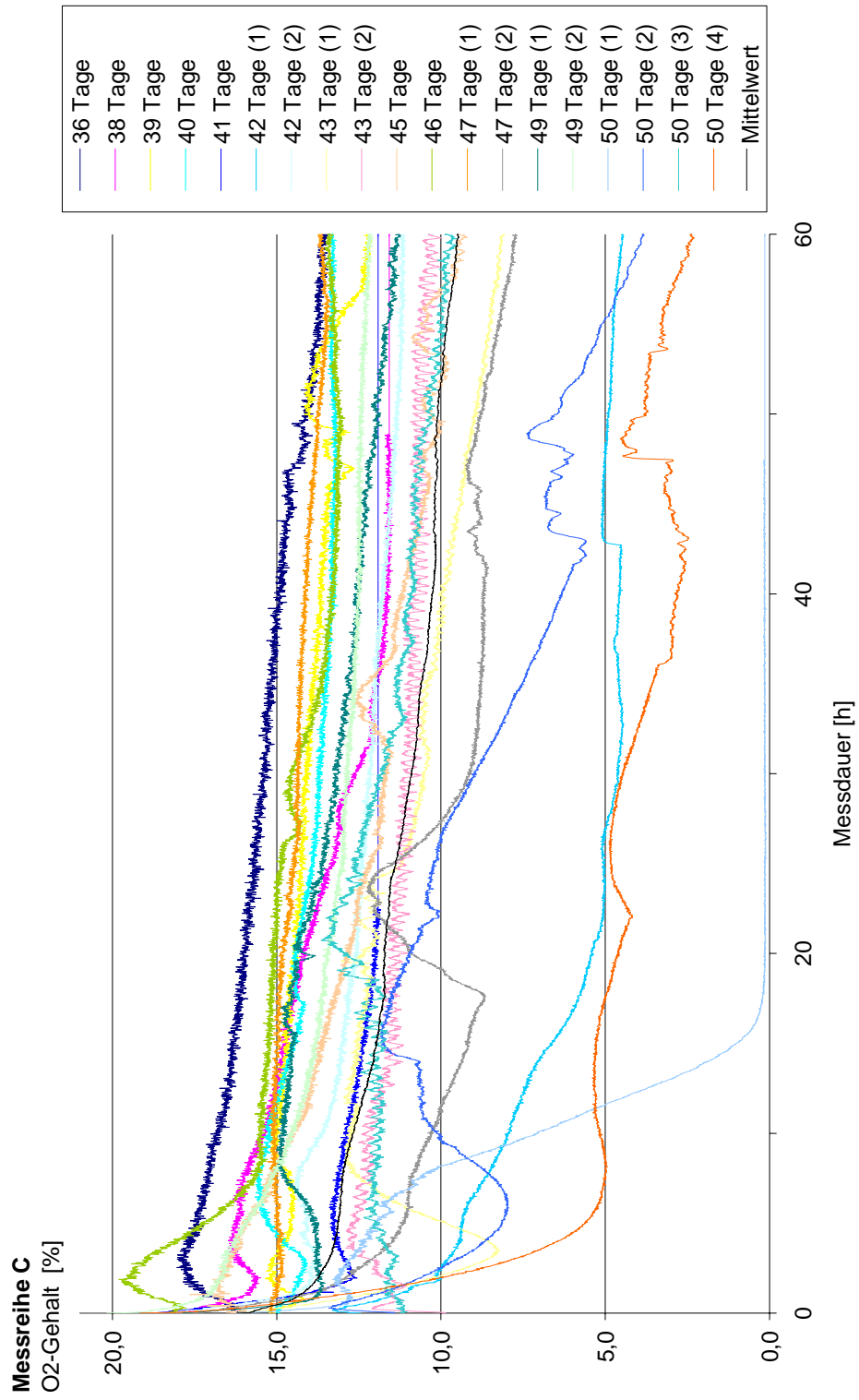


Abb.20 Sauerstoffgraphen der Messreihe C  
Sauerstoffgraphen, ermittelt in unterschiedlichen Kultivierungsstadien der PU-Konstrukte (farbig) und Mittelwertgraph (schwarz)

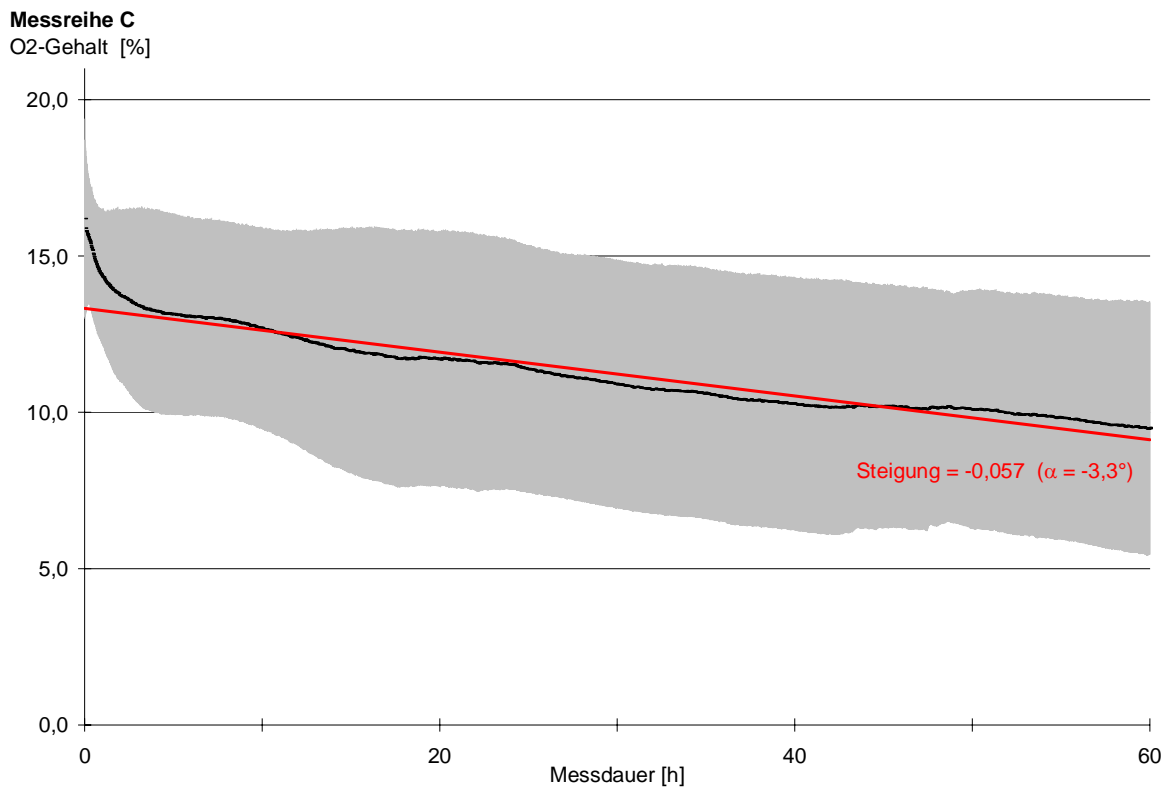


Abb.21 Mittelwertgraph plus Standardabweichung der Messreihe C

	O <sub>2</sub> -Gehalt(%) nach		
	20 h	40h	60h
Messreihe A	12,1 ( $\pm 2,16$ )	10,5 ( $\pm 2,46$ )	9,5 ( $\pm 2,46$ )
Messreihe B	13,0 ( $\pm 4,09$ )	11,9 ( $\pm 4,10$ )	10,4 ( $\pm 4,28$ )
Messreihe C	11,7 ( $\pm 4,08$ )	10,3 ( $\pm 4,05$ )	9,5 ( $\pm 4,04$ )
Messreihe D1	8,8 ( $\pm 4,71$ )	7,3 ( $\pm 4,32$ )	6,6 ( $\pm 4,14$ )
Messreihe D2	11,0 ( $\pm 1,83$ )	9,3 ( $\pm 2,47$ )	7,7 ( $\pm 3,67$ )

Abb.22 Durchschnittlicher O<sub>2</sub>-Gehalt der Messreihen A bis D2 nach 20 / 40 / 60 h Messung

### Messreihe D1

In der Messreihe D1 wurden 15 PU-Konstrukte vom Kultivierungszeitraum 51-70 Tage untersucht (Abb.23, Abb.24).

Ähnlich den Messreihen A und B zeigte sich ein initialer Anstieg der O<sub>2</sub>-Durchschnittswerte, gefolgt von einem starken Abfall bis zum Messzeitpunkt 10,7 Stunden, an dem der Wert nochmals minimal anstieg, ab dann aber kontinuierlich abfiel.

Zu Messbeginn zeigte sich ein Wert von  $13,3(\pm 4,28)\%$  O<sub>2</sub>, am Messende ein Wert von  $6,6(\pm 4,14)\%$  O<sub>2</sub>, eine Abnahme um 50,4%.

Bereits nach nur 9,6 Stunden sank in dieser Messreihe der durchschnittliche Sauerstoffgehalt unter 10%.

Nach 60 Stunden der Messung lagen die Werte der einzelnen Konstrukte zwischen 0,7 und 13,4% O<sub>2</sub>, 11 von 15 Konstrukten unter 10% O<sub>2</sub>, 5 von 15 unter 5% O<sub>2</sub>.

Die Durchschnittswerte nach 20, 40 und 60 Stunden waren niedriger als die Werte in den Messreihen A, B und C (Abb.22).

Auch in dieser Messreihe waren die zum Teil großen Schwankungen einiger Messkurven auffällig (Abb.23).

Die Steigung(m) des Mittelwertgraphen (Abb.24) betrug  $-0,058$ , was einem Neigungswinkel von  $\alpha = -3,3^\circ$  entspricht.

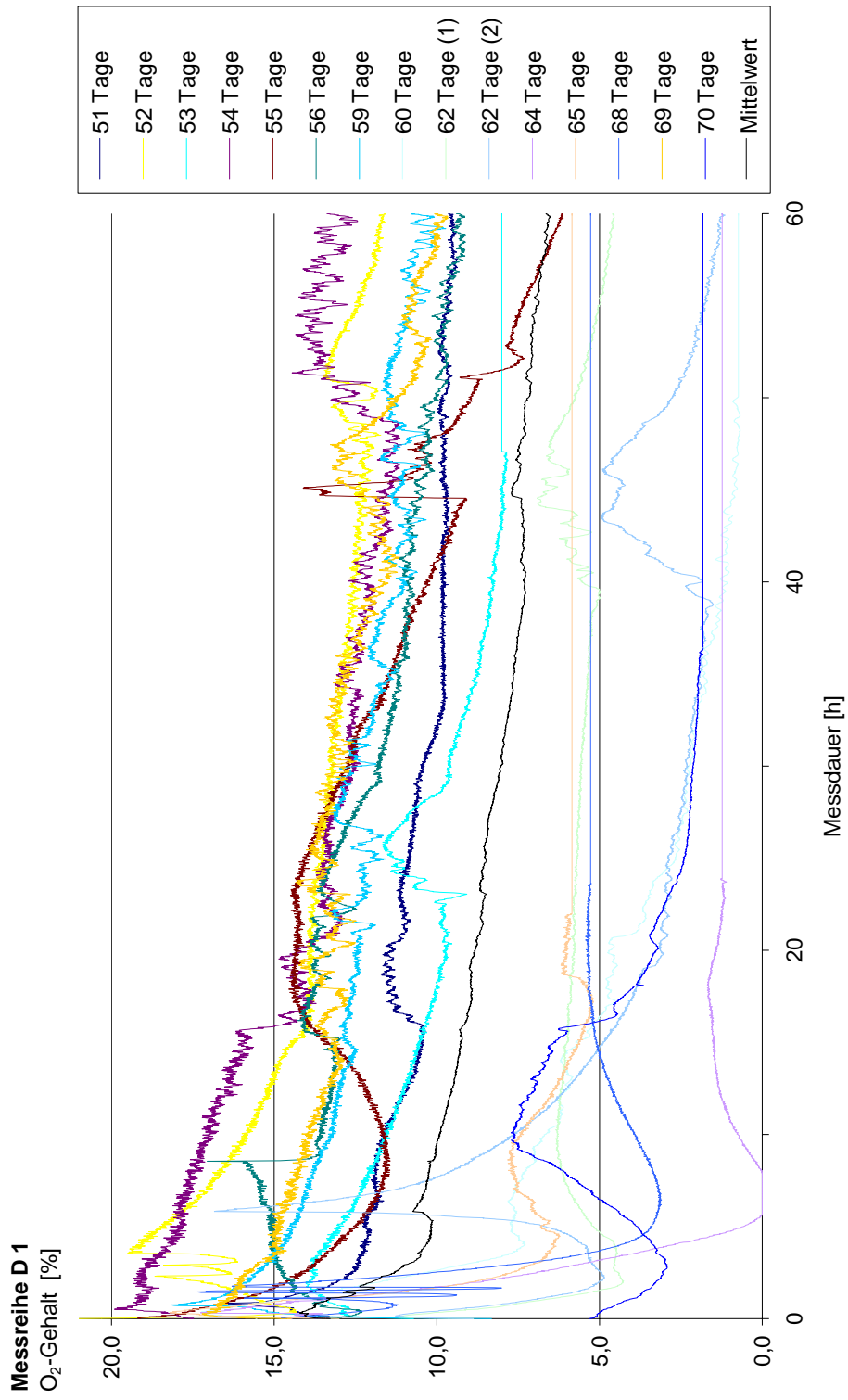


Abb.23 Sauerstoffgraphen der Messreihe D 1  
Sauerstoffgraphen, ermittelt in unterschiedlichen Kultivierungsstadien der PU-Konstrukte (farbig) und Mittelwertgraph (schwarz)



**Messreihe D 1**  
O<sub>2</sub>-Gehalt [%]

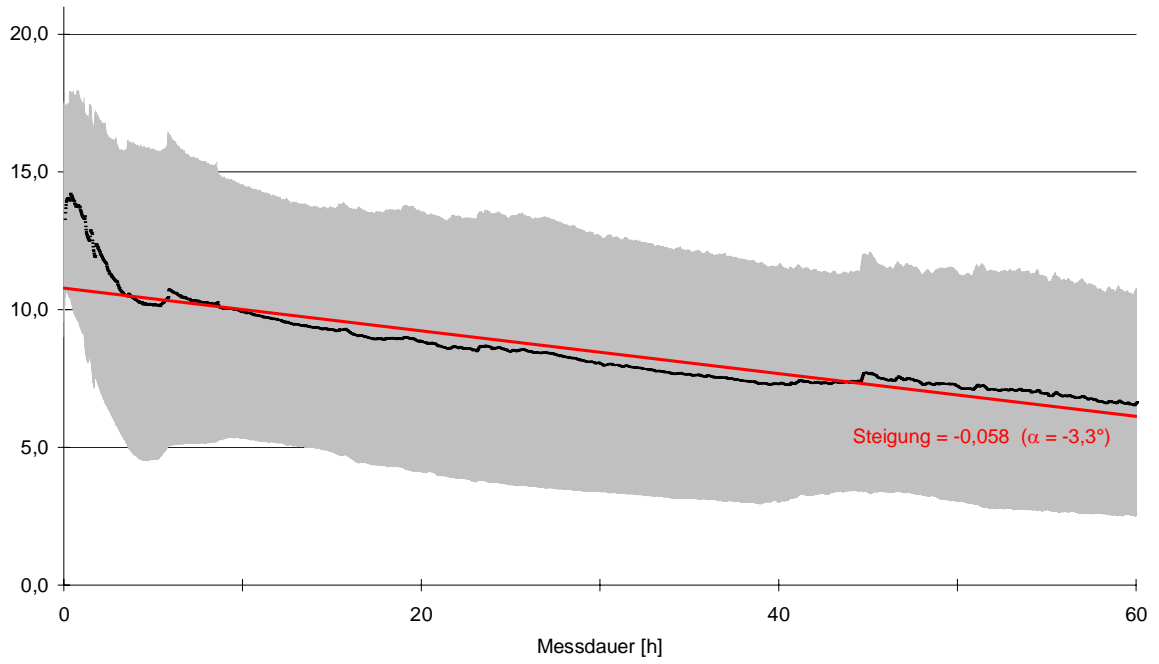


Abb.24 Mittelwertgraph plus Standardabweichung der Messreihe D 1

## Messreihe D2

In Messreihe D2 wurden wie in Messreihe D1 Konstrukte mit dem Kultivierungsalter 51-70 Tage untersucht. Diese Messreihe beinhaltete die Messung an 16 Konstrukten (Abb.25, Abb.26).

Wie in anderen Messreihen beobachtet, folgte auch hier einem anfänglichen Anstieg eine kontinuierliche Konzentrationsabnahme.

Obwohl die Versuchsbedingungen identisch zur Messreihe D1 waren, fiel der durchschnittliche Sauerstoffgehalt erst nach 34,4 Stunden unter 10% und damit zu einem früheren Zeitpunkt als in den Messreihen A und C, aber zu einem späteren Zeitpunkt als in Messreihe D1.

Zu Messbeginn wurden  $13,4(\pm 3,87)\%$  O<sub>2</sub>, nach 60 Stunden  $7,7(\pm 3,67)\%$  O<sub>2</sub> gemessen, ein Abfall um 42,5%.

Am Messende nach 60 Stunden lagen die Werte von 11 von 16 Konstrukten unter 10%, 3 von 16 unter 5% O<sub>2</sub>.

Der Wert eines PU-Konstruktes (65 Tage) fiel trotz einwandfrei funktionierender Messvorrichtung nach 59,5 Stunden auf 0%.

Die Durchschnittswerte der Messung nach 20, 40 und 60 Stunden lagen zwischen 17% und 27% höher als in Messreihe D1, waren aber niedriger als in den Messreihen A, B und C (Abb.22).

Auch in dieser Messreihe fielen die erheblichen Schwankungen mancher Graphen auf (Abb.25).

Die Steigung(m) des Mittelwertgraphen (Abb.26) betrug  $-0,072$ , was einem Neigungswinkel von  $\alpha = -4,1^\circ$  entspricht.

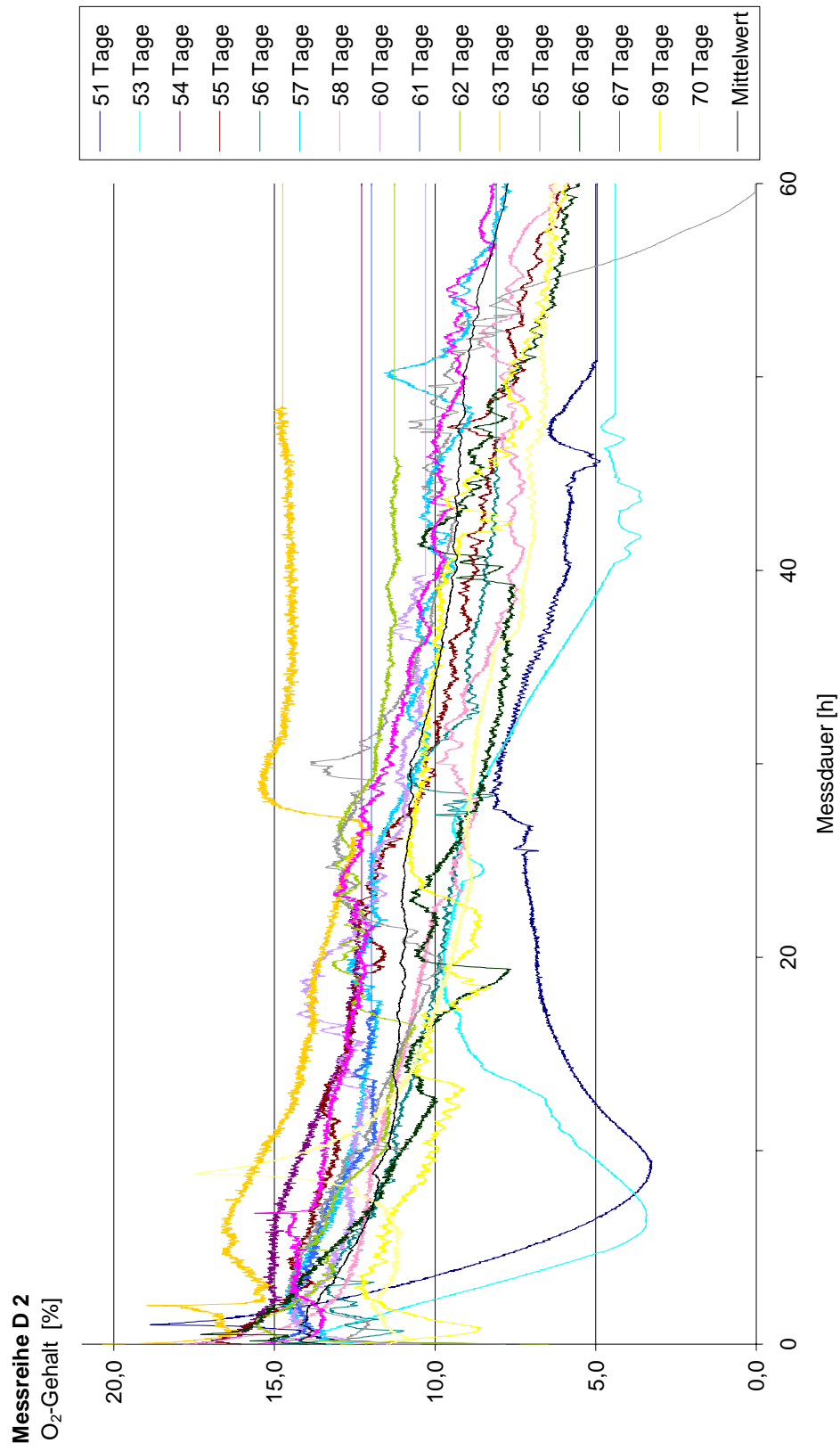


Abb.25 Sauerstoffgraphen der Messreihe D 2  
Sauerstoffgraphen, ermittelt in unterschiedlichen Kultivierungsstadien der PU-Konstrukte (farbig) und Mittelwertgraph (schwarz)

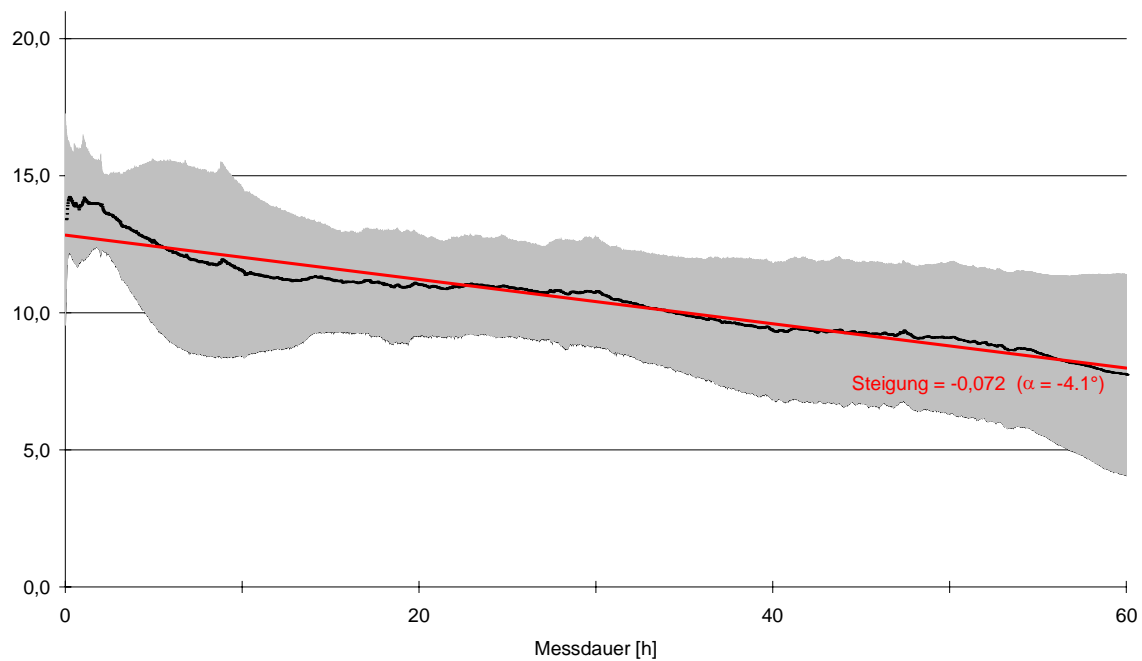
**Messreihe D 2**O<sub>2</sub>-Gehalt [%]

Abb.26 Mittelwertgraph plus Standardabweichung der Messreihe D 2

#### 4.4 Nassgewicht der Konstrukte

Unmittelbar nach Beendigung der Sauerstoffmessungen wurden die Konstrukte mit Hilfe von Kompressen von anhaftendem Medium befreit und gewogen.

In Messreihe A waren die Konstrukte im Mittel  $33,3\text{mg} \pm 4,9$  schwer. Messreihe B zeigte im Vergleich dazu eine Gewichtszunahme um 14% auf  $38,1\text{mg} \pm 5,8$ . Sowohl Messreihe C mit einem Gewicht von  $37,4\text{mg} \pm 8,0$  als auch Messreihe D1 mit  $36,7\text{mg} \pm 8,9$  zeigten eine geringe Gewichtsabnahme von 2% bzw. 4% in Bezug auf Messreihe B. Das höchste Gewicht konnte in Messreihe D2 mit  $39,1\text{mg} \pm 6,1$  berechnet werden, 6,5% mehr als in Messreihe D1, obwohl beide Messreihen Konstrukte gleichen Kultivierungsalters beinhalteten (Abb.27).

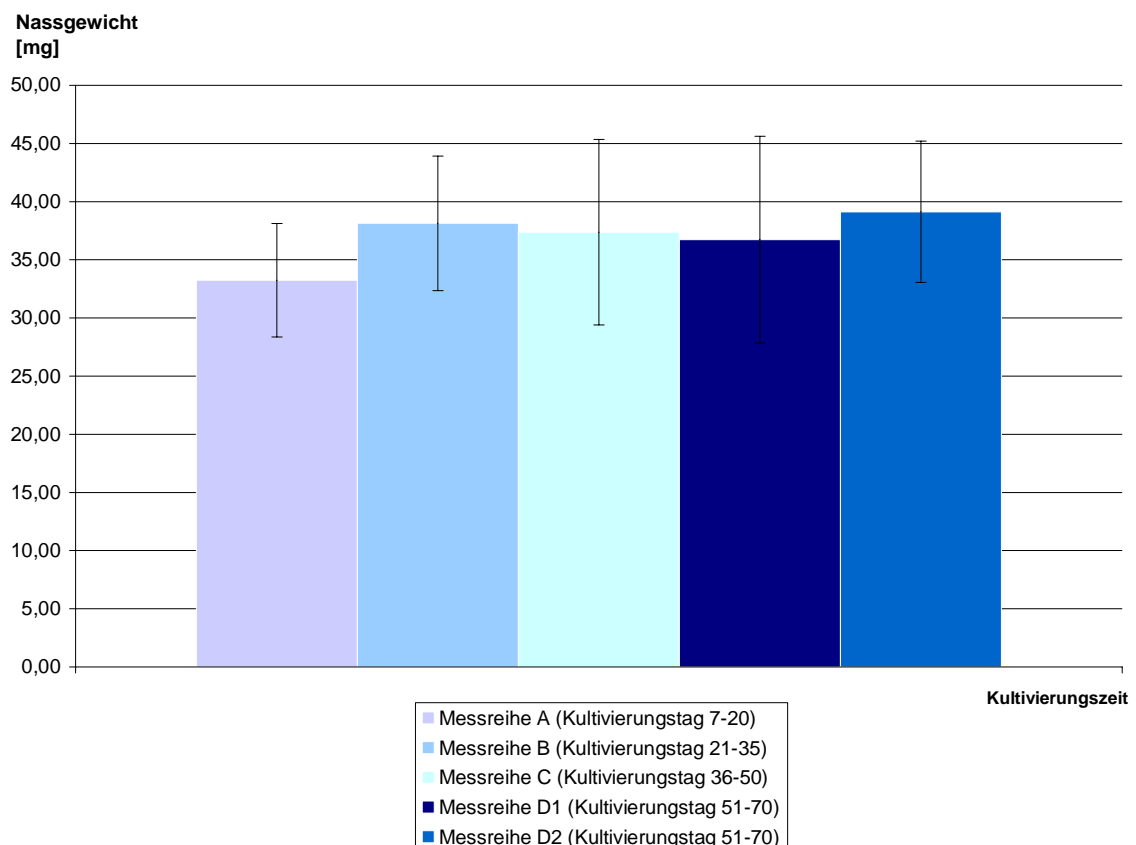


Abb.27 Darstellung des durchschnittlichen Nassgewichts (plus Standardabweichung) der Konstrukte in den unterschiedlichen Messreihen

#### 4.5 Vitalität

Bei der Bestimmung der Vitalität der Chondrozyten in den PU-Konstrukten wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Propidiumiodid (PI) und Fluoresceindiacetat (FDA) eingesetzt.

Lebende Zellen werden durch FDA spezifisch angefärbt und erscheinen unter dem Fluoreszenzmikroskop grün, tote Zellen wiederum werden durch PI markiert und erscheinen rot.

Teile der einzelnen PU-Konstrukte wurden mit dem Skalpell in möglichst dünne Scheiben geschnitten und mit dem Doppelfarbstoff versehen. Danach erfolgte eine Auszählung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die Vitalität wurde berechnet nach der Formel:

$$\text{Vitalität} = \frac{\text{Anzahl der lebenden Zellen}}{\left( \text{Anzahl der lebenden Zellen} + \text{Anzahl der toten Zellen} \right)}$$

Das Anfärben zeigte in Messreihe A eine Vitalität von 56,3%(±7,6), in Messreihe B 46,3%(±12,5), in Messreihe C 47,5%(±23,3), in Messreihe D1 50,8%(±14,3) und in Messreihe D2 47,0%(±18,9).

Trotz der hohen Kultivierungsdauer von 50-70 Tagen in den Messreihen D1 und D2 war die Vitalität in diesen beiden Gruppen ähnlich der Vitalität in den Messreihen mit geringerer Kultivierungszeit (Abb.28, Abb.29, Abb.30).

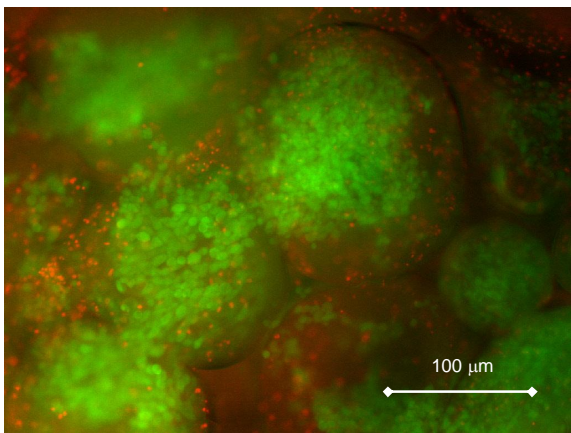


Abb. 28 Beispiel Lebend-/Totfärbung, Kultivierungstag 25

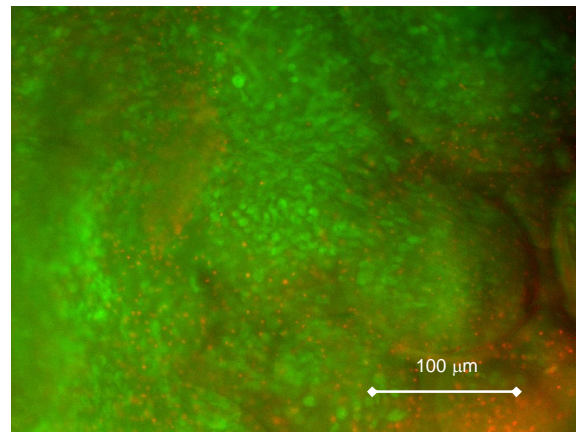


Abb. 29 Beispiel Lebend-/Totfärbung, Kultivierungstag 50

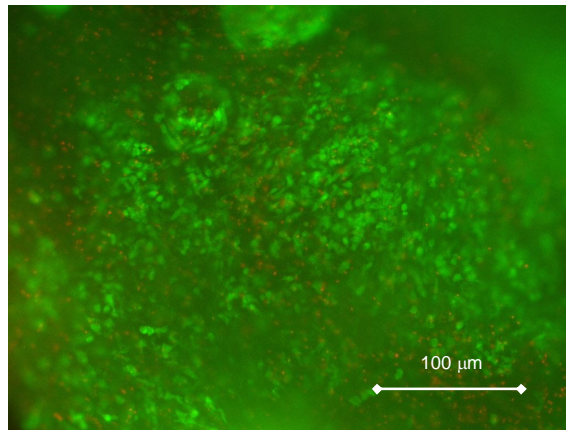


Abb. 30 Beispiel Lebend-/Totfärbung, Kultivierungstag 68

## 4.6 Biochemische Verfahren

### 4.6.1 Gehalt an Glykosaminoglykanen

Zur Quantifizierung der Glykosaminoglykane (GAG), die eine entscheidende Komponente der extrazellulären Matrix des hyalinen Knorpels darstellen, wurde der DMMB-Assay eingesetzt.

GAG bildet mit DMMB einen blauen Farbkomplex, der photometrisch bei 523 nm gemessen wurde und in Anlehnung an Arbeiten von Farndale (Farndale 1986) gegen eine Standardreihe aus einer Chondroitinsulfat-Lösung gemessen wurde. Mit Erstellung einer Eichgeraden und unter

Verwendung der Geradengleichung (Abb.31), ließ sich der GAG-Gehalt der einzelnen Konstrukte berechnen.

Die Extinktionen der Proben wurden dreifach bestimmt.

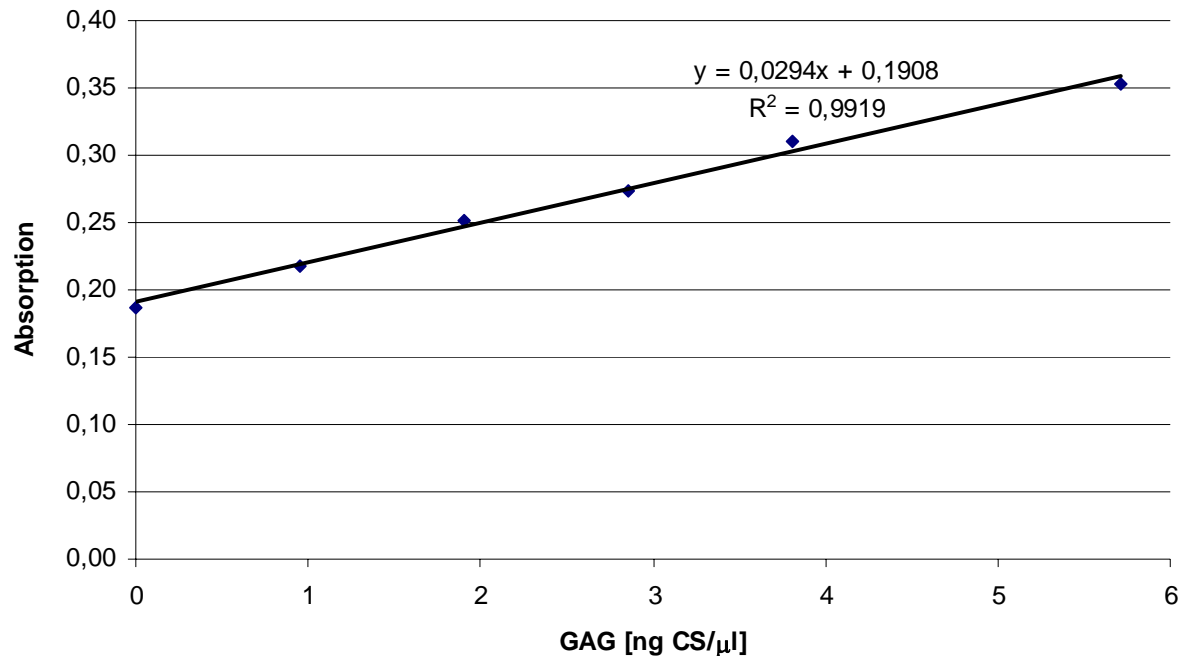


Abb.31 Beispiel einer Eichgeraden zur Berechnung des GAG-Gehaltes

Der berechnete GAG-Gehalt in Messreihe A lag bei  $177,8(\pm 94,0)$  µg/ml. Ein leichter Anstieg auf  $190,8(\pm 90,4)$  µg/ml wurde in Messreihe B errechnet. Von da zeigte sich ein Abfall des Gehalts an GAG in Messreihe C auf  $149,5(\pm 113,3)$  µg/ml und weiter in Messreihe D1 auf  $140,2(\pm 55,1)$  µg/ml. Auffällig war ein um 41% niedrigerer GAG-Gehalt in Messreihe D1 zu D2. Obwohl beide Messreihen unter identischen experimentellen Bedingungen durchgeführt wurden und Knorpelzellen des gleichen Kultivierungszeitraums beinhalteten, zeigte sich in D2 ein GAG-Gehalt von  $239,2(\pm 186,1)$  µg/ml.

In allen Messreihen konnten Glykosaminoglykane und damit Bestandteile der Knorpelgrundsubstanz nachgewiesen werden. Es zeigten sich große Streuungen um die Mittelwerte in den einzelnen Messreihen und eine deutlicher Unterschied des GAG-Gehalts in den Messreihen des gleichen Kultivierungszeitraums, D1 und D2 (Abb.32).



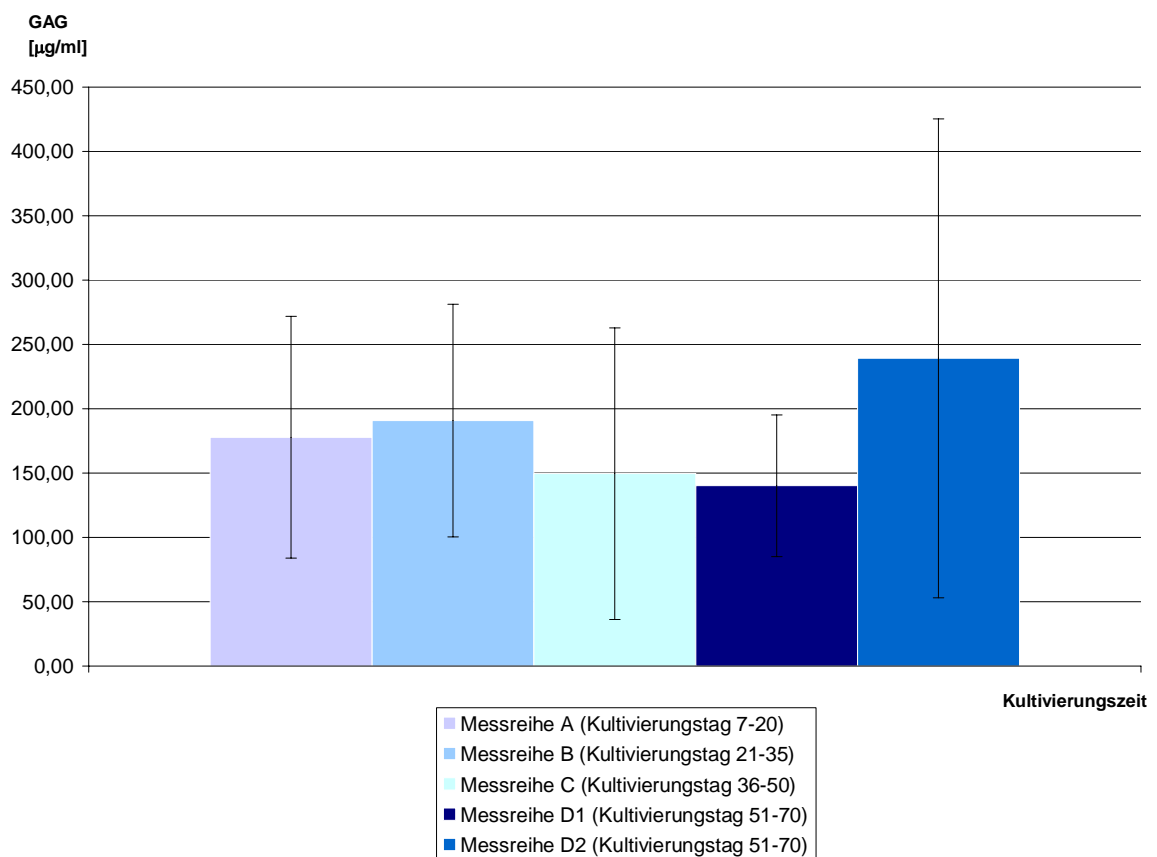


Abb.32 Darstellung des durchschnittlichen Glykosaminoglykan- Gehalts (plus Standardabweichung) der Konstrukte in den unterschiedlichen Messreihen

#### 4.6.2 Bestimmung DNA-Gehalt/Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit dem Hoechst-Assay, indirekt über die Bestimmung der Gesamt-DNA, errechnet. Der gesamte DNA-Gehalt eines Chondrozyten wurde nach Kim (Kim 1988) mit 7,7pg veranschlagt.

Unter Verwendung des Farbstoffes Hoechst 33258 konnten die einzelnen Proben fluorimetrisch gegen eine Standardverdünnungsreihe aus Kalbsthymus-DNA gemessen werden. Dadurch ergaben sich eine Eichgerade und die dazugehörige Geradengleichung (Abb.33), mit deren Hilfe die Zellzahl der einzelnen PU-Konstrukte bestimmt werden konnte.

Die Emissionen der Proben wurden dreifach bestimmt.

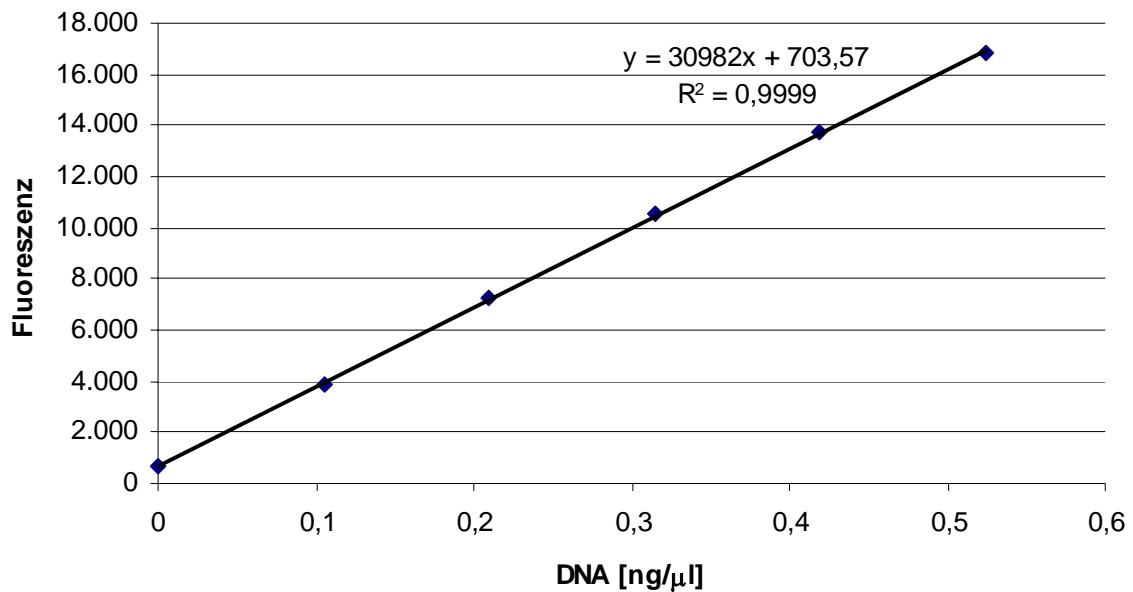


Abb.33 Beispiel einer Eichgeraden zur Berechnung der Gesamtzellzahl

Alle Messreihen lagen im Mittel über der einen Million Zellen, die jedem PU-Konstrukt zu Beginn eingepflegt wurden.

Von Messreihe A mit  $1,12 \times 10^6 \pm 1,89 \times 10^5$  Zellen stieg die Zellzahl in Messreihe B um 24% auf  $1,38 \times 10^6 \pm 5,90 \times 10^5$ . In Messreihe C verringerte sich die Zellzahl gering um 4% auf  $1,33 \times 10^6 \pm 5,17 \times 10^5$  und in Messreihe D1 nochmals um 4% auf  $1,27 \times 10^6 \pm 5,31 \times 10^5$ .

Ähnlich der Bestimmung des GAG-Gehalts war auch bei der Berechnung der Zellzahl der Unterschied auffällig von Messreihe D1 zu D2. D2 zeigte eine um 10% höhere Zellzahl im Mittel als D1 (Abb.34).

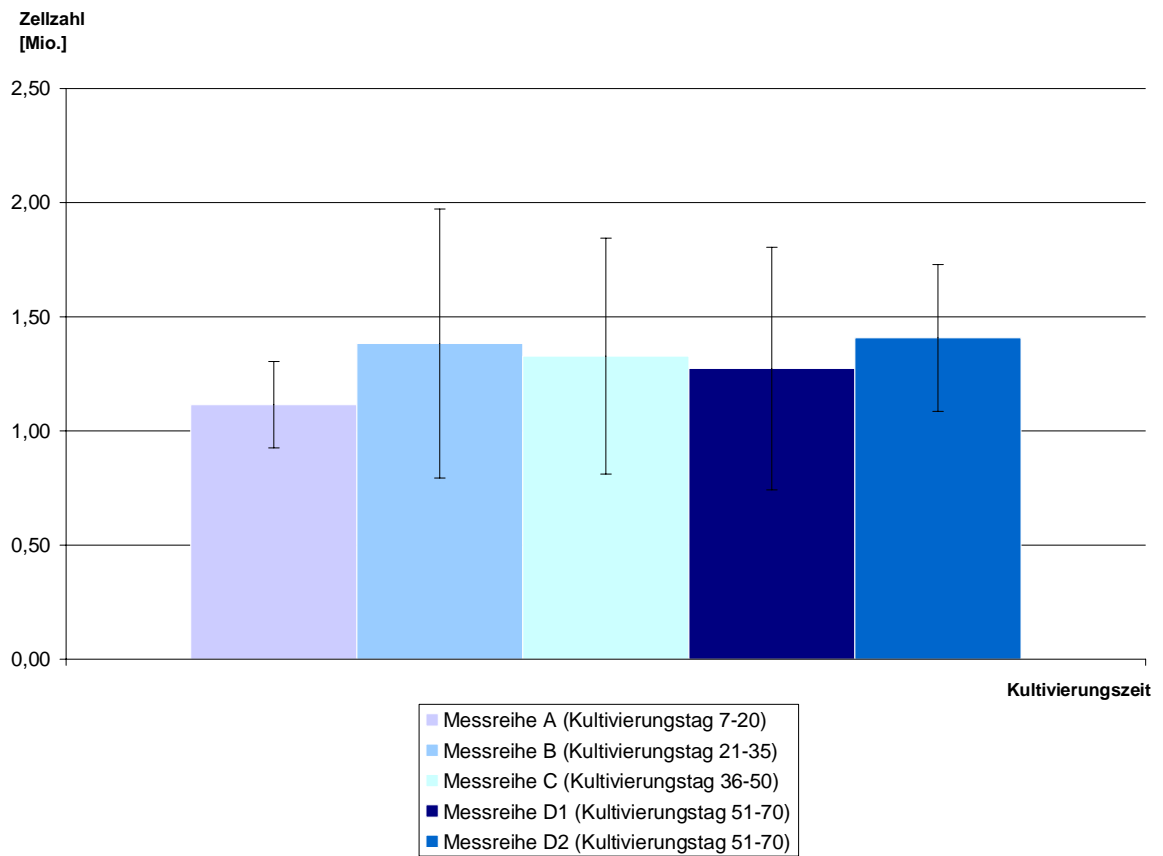


Abb.34 Darstellung der durchschnittlichen Gesamtzellzahl (plus Standardabweichung) der Konstrukte in den unterschiedlichen Messreihen

---

## 5 Diskussion

Sauerstoff spielt eine zentrale Rolle bei der Kultivierung von Chondrozyten und Knorpelgewebe. Abgesehen davon, dass er ein essentieller Nährstoff ist, beeinflusst er den Zellstoffwechsel und die Produktion der Extrazellulärmatrix (Lane 1977, Murphy 2001, Domm 2002).

Bis heute sind die Rolle und die Effekte des Sauerstoffgehalts in gezüchtetem Knorpel nicht komplett verstanden. Unterschiedliche Sauerstoffpartialdrücke während der Kultivierung von Chondrozyten bewirken eine Änderung des Phänotyps (Hansen 2001, Murphy 2001, 2004, Domm 2002, Malda 2004, Lewis 2005).

### 5.1 Sauerstoffmessverfahren

Um die Kultivierungsbedingungen von tissue engineerem Gewebe zu optimieren, ist es unumgänglich die unterschiedlichen Sauerstoffniveaus in Knorpelkonstrukten, beimpft mit humanen Zellen, zu verstehen. Frühere Studien befassten sich entweder nur mit Messungen an Knorpel tierischen Ursprungs (Kellner 2002, Malda 2004, Heywood 2006) oder benutzten zur Sauerstoffmessung an Konstrukten Techniken mit begrenzter Auflösung (Bacon 1987, Malda 2004, Kuang 2007). In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurden zur Aufzeichnung des Sauerstoffgehalts optische Sensoren eingesetzt, die eine exakte, kontinuierliche Messung und Aufzeichnung der Ergebnisse ermöglichten. Optische Sauerstoffsensoren erfassen bei Anwesenheit von O<sub>2</sub> Änderungen der Quantenausbeute und werten das Vorhandensein von fluoreszierenden oder phosphoreszierenden Molekülen aus. Es wurden Glasfasermikrosensoren in Knorpelkonstrukte eingebracht, an deren Membran es zu einer direkten Kontaktreaktion kam. Diese Reaktion konnte amplifiziert und umgesetzt werden in ein kontinuierliches elektrisches Signal, das eine Aufzeichnung ermöglichte.

---

Nach der Kalibrierung arbeiteten die Glasfasermikrosensoren exakt, was regelmäßig überprüft wurde durch eine Messung des Sauerstoffgehalts der Luft. Das Messsystem lieferte stets ein Ergebnis von 21% O<sub>2</sub>.

Diese Glasfasermikrosensoren verbrauchen keinen Sauerstoff während des Messvorgangs und sind sensitiver als konventionelle Elektroden. Das Messen der Lumineszenzabklingzeit, wie es in diesem Messsystem angewandt wird, hat etliche Vorteile im Vergleich zu konventionellen Messvorrichtungen. Zum einen ist die Lumineszenzabklingzeit nicht abhängig von Intensitätsschwankungen der Lichtquelle und der Sensitivität des Detektors. Zum anderen ist die Abklingzeit weitgehend unabhängig von der Konzentration der Farbstoffschicht und die Durchlässigkeit des Indikatorfarbstoffs hat keinen Einfluss auf das Messsignal. Zusätzlich wird die Abklingzeit nicht von optischen Eigenschaften der Proben wie Trübung, Brechungsindex und Farbe beeinflusst (PreSens 2007).

Bei den optischen Sensoren müssen im Gegensatz zu konventionellen elektrochemischen Messverfahren keine Elektrolyte, Anoden oder Membrane gereinigt oder ausgetauscht werden. Die Messungen sind driftfrei und beinhalten keine Messfehler durch verbrauchten Sauerstoff während der Messung.

Die Sauerstoffmessungen der einzelnen Konstrukte wurden bis zum Erreichen eines konstanten Plateaus, nicht aber länger als 60 Stunden durchgeführt. Vorversuche zeigten, dass eine verlängerte Messzeit die Gefahr einer Besiedelung mit Schimmelpilzen, trotz Zusatz von Antimykotikum/Antibiotikum im Kulturmedium, stark erhöhte. Um eine solche Kontamination sicher auszuschließen wurde direkt im Anschluss an die Sauerstoffmessungen der Gehalt an O<sub>2</sub> im Kulturmedium bestimmt, da sich gezeigt hatte, dass mit Schimmel befallenes Medium konsequent Sauerstoffwerte unter 10% aufwies. Weitere Vorversuche zeigten auch, dass es durch die hohe Sensitivität der Sauerstoffsonden und der damit verbundenen Empfindlichkeit, bei längeren Messzeiten vermehrt zu Artefakten bei der Aufzeichnung des Sauerstoffgehalts kam.

---

## 5.2 Kultivierung in unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen

Hypoxische Kulturbedingungen (geringer Sauerstoffpartialdruck von 5%) können zu einem Anstieg der Kollagen II- und der Glykosaminoglykan-Synthese führen. Zusätzlich kann eine Redifferenzierung der Zellen nach Monolayerkultur optimiert werden durch das Einbringen der Zellen in dreidimensionale Trägergerüste, kombiniert mit hypoxischen Sauerstoffkonzentrationen (Murphy 2001, Domm 2002, Hashimoto 2006). Eine Verbindung von Hypoxie (5% O<sub>2</sub>) und intermittierendem hydrostatischem Hochdruck führte bei Hansen (Hansen 2001) zu einer gesteigerten Chondrozytenproliferation und einer vermehrten makromolekularen Synthese.

Hoher Sauerstoffpartialdruck während der Kultivierung scheint notwendig zu sein für eine ausreichende Sauerstoffversorgung über Diffusionsvorgänge (Zhou 2004). Grimshaw kultivierte Chondrozyten bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen (<0,1%, 1%, 5%, 10% und 20%) und zeigte, dass die maximale Matrixsynthese bei 10% O<sub>2</sub> erfolgte. Bei <0,1% O<sub>2</sub> war die Zellfunktion schwer gestört (Grimshaw 2000). Ähnlich waren die Ergebnisse bei Kellner, bei Sauerstoffpartialdrücken unterhalb von 11mmHg im Konstruktzentrum war eine histologische Gewebebildung nicht möglich (Kellner 2002). Die Arbeitsgruppe um O'Driscoll (O'Driscoll 1997) fand bei hyperoxischen und stark hypoxischen Bedingungen (90% bzw. 1-5% O<sub>2</sub>) eine Inhibition der Knorpelbildung und Kollagen II-Synthese. Die maximale Chondrogenese wird hier bei Sauerstoffkonzentrationen von 12-15% beschrieben. Die Analysen von Murphy zeigten eine gesteigerte Syntheseleistung von Chondrozyten bei 20% O<sub>2</sub>, verglichen mit 5% und 1% (Murphy 2001). Obradovic kam zu dem Ergebnis, dass sich in dreidimensionalen Konstrukten größere Knorpelvolumina erzeugen lassen, wenn die Sättigung mit Sauerstoff erhöht wird (Obradovic 1999).

---

### 5.3 Sauerstoffkonzentrationen in Polyurethankonstrukten

Die Knorpelkonstrukte wurden in einem Zeitraum von 7 bis hin zu 70 Tagen kultiviert und dann gemessen. Es bestand die Vermutung, dass ältere, gereifte Konstrukte am ehesten den Sauerstoffwerten von nativen humanen Knorpelbiopsien entsprachen, wie sie in Vorarbeiten der Forschungsgruppe AG Tissue Engineering, Klinikum rechts der Isar mit vergleichbaren Glasfasermikrosensoren gemessen wurden. In dieser Untersuchung von 25 humanen Knorpelbiopsien zeigte sich ein durchschnittlicher Sauerstoffgehalt von 3,1% nach 60 Stunden Messung.

Die Untersuchungen in dieser experimentellen Arbeit lieferten Ergebnisse von im Durchschnitt 7,7-9,5% O<sub>2</sub> im Zentrum (~1 mm tief) der Knorpelkonstrukte am Ende der 60-Stunden-Messung. Malda (Malda 2004) benutzte eine ähnliche Glasmikroelektrode zur Sauerstoffmessung an nativem Rinderknorpel und an tissue engineernten Knorpelkonstrukten bovinen Ursprungs. Bei den Knorpelkonstrukten fand er in einer Tiefe von 2 mm Werte von 2-5% O<sub>2</sub>, in einer Tiefe von 1 mm ähnlich hohe Sauerstoffwerte von 4-10% O<sub>2</sub>. Er vermutete, dass das sauerstoffgesättigte Medium, das die Konstrukte umgibt, ursächlich für die hohen Werte ist. Auch die Konstrukte in dieser Arbeit, beimpft mit humanen Chondrozyten, wurden in sauerstoffgesättigtem DMEM-Medium kultiviert und gemessen. Die Messungen von Malda lieferten auch niedrigere Werte um 4% O<sub>2</sub>, allerdings beimpfte er seine Konstrukte mit fast doppelt so vielen Chondrozyten. Die höhere Zelldichte kann ursächlich für diese Werte sein, durch den erhöhten Sauerstoffverbrauch der Zellen sinkt der O<sub>2</sub>-Gehalt im Konstrukt. Ein weiterer Aspekt ist die Tatsache, dass Malda eine andere Trägermatrix untersucht hat, die sich nur näherungsweise mit der Polyurethan-Matrix vergleichen lässt. Auch Kellner (Kellner 2002) untersuchte Sauerstoffkonzentrationen in Konstrukten bovinen Ursprungs und nutzte dazu ebenfalls einen fluoreszierenden optischen Sensor. Kellner erfasste damit Sauerstoffwerte von ~0-1% im Zentrum der Konstrukte nach einer Kultivierungszeit von

---

20 Tagen. Auch hier wurde eine andere Trägermatrix (PGA-Netze) verwendet und diese mit fünffacher Menge an bovinen Chondrozyten beimpft. Auffällig war, dass sich in der Kultivierungszeit von 0–20 Tagen der Sauerstoffgehalt im Zentrum der Konstrukte nur minimal änderte ( $\sim 0$ -2,5%). Im Gegensatz dazu konnten mit vorliegender Arbeit Ergebnisse von  $\sim 7$ -12% O<sub>2</sub> in diesem Kultivierungszeitraum gemessen werden. Auch in einer weiteren Arbeit von Malda (Malda 2004) wurden höhere Werte als bei Kellner festgestellt. Im Kultivierungszeitraum von 7-14 Tagen lag der Sauerstoffgehalt bei  $\sim 5$ -9% O<sub>2</sub>, was sich eher mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit deckt.

Obwohl bei der Messung der länger kultivierten Knorpelkonstrukte niedrigere Messwerte erwartet wurden als in den Vorversuchen zur Messung an Nativknorpeln, konnte dies nicht bestätigt werden. Auch in der Gruppe der am längsten kultivierten Konstrukte (51-70 Tage) zeigten sich durchschnittliche Sauerstoffwerte von 6,6-7,7% im Gegensatz zu 3,1% bei den nativen Knorpelbiopsien. Zwar konnte eine Abnahme des Sauerstoffgehalts in den Konstrukten mit zunehmender Kultivierungszeit (ausgenommen Messreihe A) beobachtet werden, allerdings fielen die Werte nicht so tief wie beim Nativknorpel. Die Arbeiten von Kellner und Malda zeigten hier gegenteilige Ergebnisse. Allgemein wird davon ausgegangen, dass durch die höhere Zelldichte in den tissue engineernden Konstrukten und dem damit erhöhten Sauerstoffverbrauch, die Sauerstoffkonzentrationen niedriger sind wie in Nativknorpel. Außerdem besitzt nativer Knorpel einen langsameren Stoffumsatz und einen niedrigeren Sauerstoff- und Nährstoffbedarf (Scott 1992, Caplan 1997). Im Kontrast dazu müsste der Sauerstoffbedarf und –verbrauch in wachsendem und Matrix- produzierendem Gewebe sehr viel höher sein und dadurch der Gehalt an O<sub>2</sub> niedriger (Silver 1975).

Andererseits wurde in der Arbeit von Kellner (Kellner 2002) gezeigt, dass Nativknorpel einen sehr viel größeren Anteil an sauerstoffarmer Extrazellulärmatrix besitzt als die gezüchteten Konstrukte. Dies könnte für einen höheren Gehalt an O<sub>2</sub> in den Knorpelkonstrukten sprechen. Ein



---

weiteres Argument ist, dass die Messsonden im Nativknorpel tiefer appliziert wurden, was eine Abnahme des Sauerstoffgehalts zur Folge haben kann, allerdings wurde dadurch kein so großer Effekt erwartet. Zudem können gezüchtete Konstrukte Unterschiede im chondrogenen Phänotyp und in der knorpelspezifischen Matrix zeigen (Hansen 2001, Domm 2002, Kellner 2002). Es wurden keine Untersuchungen zu Zelldichte, Zellzahl oder Extrazellulärmatrix in den Nativknorpeln durchgeführt wurden, weshalb dieses Ergebnis nicht ausreichend diskutiert werden kann.

Die Sauerstoffwerte in Messreihe A (Kultivierungszeitraum 7-20 Tage) waren niedriger als in Messreihe B (Kultivierungszeitraum 21-35 Tage), was so nicht erwartet wurde. Es wurde vermutet, dass sich durch Vermehrung der Zellen und Zunahme der Extrazellulärmatrix im Laufe der Kultivierungszeit, der Sauerstoffgehalt im Konstrukt kontinuierlich verringert. Messreihe A zeigte hier ein gegenteiliges Ergebnis. Ursächlich hierfür könnte die um ~10% höhere Vitalität der Zellen in Messreihe A, die die frisch beimpften Konstrukte beinhaltete, im Gegensatz zu Messreihe B sein. Mehr vitale Zellen verbrauchen mehr O<sub>2</sub>. Die Vitalität in den anderen Messreihen blieb relativ konstant bei Werten um ~46-50% und fiel auch nicht in den länger kultivierten Konstrukten ab.

Kellner und Malda entdeckten in ihren experimentellen Untersuchungen ein starkes Gefälle der Sauerstoffkonzentrationen innerhalb der tissue engineernden Konstrukte (Kellner 2002, Malda 2004a, 2004b). Dieser Gradient resultiert aus dem Verhältnis von Sauerstofftransport über Diffusion zu Sauerstoffverbrauch der Zellen.

Letztendlich können viele Faktoren Einfluss nehmen auf die messbaren Sauerstoffkonzentrationen, wie Knorpeldicke, Zelldichte und Zellverteilung, Sauerstoffgehalt im Medium, Diffusionsvermögen und Zellalter. Auch der Sauerstoffverbrauch pro Zelle in Abhängigkeit von anderen Nährstoffen wie beispielsweise Glucose wird diskutiert (Stockwell 1979, Zhou 2004).

---

In verschiedenen Veröffentlichungen sind Werte von ~0-7,9% O<sub>2</sub> als kritische Level für Knorpelwachstum und Produktion von extrazellulärer Matrix zu lesen (Brighton 1969, Silverton 1989, O´Driscoll 1997, Kellner 2002). Ähnliche Daten lassen sich über natürlichen Knorpel unter physiologischen Bedingungen finden (Brighton 1971, Lee 1997). Die Ergebnisse für die länger kultivierten Konstrukte (Messreihe D1, D2) liegen innerhalb dieser Daten, Werte der Messreihen A, B und C mit 9,5-10,4% O<sub>2</sub> darüber.

Die Steigungen der Mittelwertgraphen der Messreihen A – D2 lagen nach einem stärkeren Abfall in den ersten 10 Stunden der Messung alle in einem Bereich von  $m = -0,057$  bis  $-0,072$ , was Neigungswinkeln von  $\alpha = -3,3^\circ$  bis  $-4,1^\circ$  entspricht. Es war kein Zusammenhang zwischen der Länge der Kultivierungszeiten innerhalb der Messreihen und der Steigung der Mittelwertgraphen zu erkennen. Der Neigungswinkel in allen Messreihen änderte sich nur minimal.

#### 5.4 Nassgewicht, Gehalt an Glykosaminoglykanen und Gesamtzellzahl

Am Anfang der Kultivierung zeigte sich eine geringe Gewichtszunahme der PU-Konstrukte von Messreihe A zu Messreihe B. Danach blieb das Gewicht relativ konstant. Biochemisch konnte die Bildung von Glykosaminoglykanen, Bestandteil der Knorpelmatrix, nachgewiesen werden. Es zeigte sich allerdings keine stärkere Zunahme des Gehalts an GAG innerhalb der Kultivierungszeit, was gleichzeitig auch zu einer Gewichtszunahme hätten führen können. Der GAG-Gehalt lag bei Werten ~150µg/ml. Eine starke, kontinuierliche Zunahme von GAG, wie es bei Kellner beschrieben wurde konnte nicht beobachtet werden (Kellner 2002). Grund hierfür kann zum einen das schon von mehreren Autoren berichtete Abdiffundieren der Matrixbestandteile ins Kulturmedium sein (Green 1971, Obradovic 1999, 2001). Zwar wurde bei der Zellbesiedelung der PU-Konstrukte Fibrinkleber benutzt, um diesen Vorgang möglichst zu

---

beschränken, er kann aber nicht ausgeschlossen werden. Zum anderen könnte die Besiedelung der Konstrukte mit nur einer Million Zellen ursächlich sein für die ausgebliebene GAG-Zunahme (Kobayashi 2008). Kobayashi und Puelacher beschreiben in ihren Arbeiten, dass für die GAG-Synthese eine Zelldichte von mindestens 25 Millionen Zellen/ml, beziehungsweise von 10-100 Millionen Zellen/ml notwendig ist, die Zell-Zell-Interaktionen und Zell-Matrix-Interaktionen ermöglicht (Puelacher 1994, Kobayashi 2008). Weitere Untersuchungen hierzu sind erforderlich. Auffällig waren die ermittelten Werte des GAG-Gehalts von Messreihe D1 zu Messreihe D2, obwohl beide Messreihen Knorpelkonstrukte des gleichen Kultivierungsalters beinhalteten. Unter gleichen Bedingungen kultiviert, gemessen und analysiert zeigte sich hier ein Sprung des GAG-Gehalts von  $\sim 140\mu\text{g/ml}$  in D1 zu  $\sim 240\mu\text{g/ml}$  in D2.

Studien, die von stärkerer GAG-Produktion in vitro berichten, hatten andere Kultivierungstechniken, verwendeten Chondrozyten anderer Herkunft, waren unterschiedlich in der Zelldichte der dreidimensionalen Kultur, benutzten andere Trägermaterialien oder kultivierten die Konstrukte unter anderem Sauerstoffpartialdruck (Green 1971, Obradovic 1999, Hansen 2001, Murphy 2001, Domm 2002, Kellner 2002, Malda 2004, Guaccio 2008).

Die Gesamtzellzahlen der Konstrukte in den unterschiedlichen Kultivierungszeiträumen waren relativ konstant zwischen  $\sim 1,2$  und  $1,4 \times 10^6$  Zellen und verhielten sich somit ähnlich wie das Gewicht und der GAG-Gehalt. Zu einer beinahe Verdoppelung der Zellzahl wie bei Kellner (Kellner 2002) in den ersten sieben Tagen Kultivierung kam es nicht. Lediglich in den ersten beiden Messreihen war ein leichter Anstieg um  $\sim 250000$  Zellen von Messreihe A zu B zu beobachten. Kellner verwendete im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit Chondrozyten vom Rind, ein anderes Trägermaterial und vor allem eine sehr viel höhere Ausgangszelldichte. Diese Faktoren können ursächlich für die unterschiedlichen Ergebnisse sein. Inwieweit das Alter der verwendeten humanen Chondrozyten und deren Differenzierungsgrad die

---

Zellproliferation beeinflusst hat, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Durch den relativ konstanten Level an GAG-Gehalt, Nassgewicht, Vitalität und Zellzahl konnte kein aussagekräftiger Zusammenhang zwischen Sauerstoffgehalt und diesen Faktoren entdeckt werden. Zwar zeigten beispielsweise Messreihe A zu Messreihe D1 einen Abfall des Sauerstoffgehalts von im Mittel 9,5 % auf 6,6%, dies konnte aber nicht mit steigender Zellzahl oder gesteigerter GAG-Synthese in Korrelation gebracht werden. Auch die Vitalität der Konstrukte in allen Messreihen blieb auf einem Niveau von ~50%, wobei keine Wechselbeziehung zu den anderen Analysen erkennbar war.

## 5.5 Ausblick und Perspektiven

Um die Kulturbedingungen für tissue-engineerte Knorpelkonstrukte zu optimieren, ist es eine Notwendigkeit, das Verhalten von Sauerstoff innerhalb dieser zu verstehen. In Zukunft müssen Wege gefunden werden, tissue-engineertes Gewebe beim Menschen einzusetzen, das dabei verlässlich mit ausreichend Sauerstoff versorgt werden kann.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Polyurethankonstrukte, mit 40µl Volumen, auch nach 70 Tagen Kultivierung im Zentrum einen Sauerstoffgehalt von im Mittel 6,6-7,7% besaßen. Es konnten weiterhin Glykosaminoglykane, als knorpelspezifischer Bestandteil der Extrazellulärmatrix, in allen Konstrukten nachgewiesen werden. Die Vitalität der Konstrukte war in allen Kultivierungsabschnitten zufrieden stellend und verschlechterte sich nicht mit längerer Kultivierungszeit. Allerdings blieb während der Kultivierungszeit eine größere Zunahme von Gewicht, GAG und Gesamtzellzahl aus. Obwohl, um eine Altersdegeneration der Zellen auszuschließen, nur Chondrozyten von Patienten, die nicht älter als 40 Jahre waren, verwendet wurden, sind weitere Untersuchungen nötig, um den Einfluss des Zellalters auf die Chondrogenese zu ermitteln. Weiterhin ist in Zukunft von Interesse,

---

inwieweit sich eine höhere Zelldichte bei der Konstruktbesiedelung, andere Kulturtechniken (beispielsweise verminderter Sauerstoffpartialdruck) oder auch eine andere Trägermatrix auf die Parameter GAG-Gehalt, Gewicht und Gesamtzellzahl auswirken. Abschließend stellt sich noch die wichtige Frage, welche Größe Polyurethankonstrukte besitzen dürfen, um noch adäquat mit Sauerstoff versorgt zu werden.

Zum Decken von Knorpeldefekten ist ein Einsatz von auch größer dimensioniertem tissue-engineertem Gewebe anzustreben, das in allen Schichten ausreichend und verlässlich mit Sauerstoff versorgt werden kann.

Die gewonnenen Ergebnisse der vorliegende Arbeit an Knorpelkonstrukten bilden die Grundlage zur Optimierung der Kulturbedingungen und verhelfen zu einem besseren Verständnis über die Rolle und die Abhängigkeiten der Sauerstoffversorgung in tissue-engineertem humanen Knorpelgewebe.

## 6 Zusammenfassung

Im klinischen Alltag gibt es einen großen Bedarf an verschiedenen Gewebearten, die zur Rekonstruktion von untergegangenen Gewebe benötigt werden. Neben den gängigen Methoden der autologen/ allogenen Transplantationen sowie dem Einsatz von alloplastischen Materialien bieten die Methoden des Tissue Engineering eine viel versprechende Alternative. Im Hinblick auf Knorpelgewebe ist es möglich, aus einer Gewebeprobe eines Patienten, größere Mengen an körpereigenen Chondrozyten zu kultivieren und damit dreidimensionale Zellträger zur Defektdeckung zu besiedeln. Allerdings sind diese Möglichkeiten bis heute beschränkt. Da Knorpel aufgrund seiner Avaskularität über Diffusionsvorgänge mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt wird, bereitet es Schwierigkeiten dickere Schichten von tissue-engineertem Knorpelgewebe im Patienten am Leben zu erhalten. Die Versorgung mit Sauerstoff spielt dabei eine Schlüsselrolle und gilt als einer der ersten limitierenden Faktoren.

Um die Rolle des Sauerstoffgehalts in tissue-engineerten Knorpelkonstrukten besser zu verstehen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Sauerstoffmessungen im Zentrum von Polyurethanzellträgern, die mit humanen Chondrozyten beimpft wurden, durchgeführt. Die Konstrukte befanden sich in sauerstoffgesättigtem Medium, die Messungen wurden zu verschiedenen Kultivierungszeiten vorgenommen, die Konstrukte dabei bis hin zu 70 Tagen kultiviert: Messreihe A (Kultivierungstag 7-20), Messreihe B (Kultivierungstag 21-35), Messreihe C (Kultivierungstag 36-50). Besonderes Interesse wurde dem letzten Kultivierungszeitraum (Kultivierungstag 51-70) gewidmet, weshalb hier zwei Messreihen (D1, D2) untersucht wurden. In Vorarbeiten der Forschungsgruppe AG Tissue Engineering, Klinikum rechts der Isar wurden Nativknorpelbiopsate mit ähnlicher Messvorrichtung untersucht und es bestand die Vermutung, dass sich gereifte, ‚adulte‘

Knorpelkonstrukte hinsichtlich des Sauerstoffgehalts ähnlich dem Nativknorpel verhalten. Die Sauerstoffmessungen wurden mit Glasfaser-Mikrosensoren der Firma PreSens durchgeführt. Diese Sensoren, die über das Prinzip der Lumineszenzlöschung den Sauerstoffgehalt im Konstrukt erfassen, erlaubten sowohl eine mikro-invasive als auch eine kontinuierliche und exakte Aufzeichnung des Sauerstoffgehalts von hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung.

Nach Beendigung der Sauerstoffmessungen wurden alle Konstrukte weiterhin nach Unterschieden in ihrem Nassgewicht, Vitalität, Gehalt an Glykosaminoglykanen und der Gesamtzellzahl analysiert.

Der Sauerstoffgehalt im Zentrum der Konstrukte lag je nach Kultivierungszeitraum im Mittel zwischen  $10,4(\pm 4,3)\%$  und  $6,6(\pm 4,1)\%$ . Die tiefsten Werte wurden wie vermutet in Messreihe D1 mit  $6,6(\pm 4,1)\%$  und Messreihe D2 mit  $7,7(\pm 3,7)\%$  gemessen, wobei in beiden Messreihen der Sauerstoffgehalt allerdings nicht annähernd den Gehalt von  $\sim 3,1\%$  O<sub>2</sub> erreichte, wie er in den Voruntersuchungen an Nativknorpeln gemessen wurde. Die Vitalität der Zellen blieb auch in dem letzten Kultivierungsstadium relativ konstant auf einem Niveau von  $\sim 50\%$ . Mit den biochemischen Analysen konnte die Bildung von Glykosaminoglykanen, einer der Hauptbestandteile der Knorpelmatrix, nachgewiesen werden. Sowohl der Gehalt an Glykosaminoglykanen, als auch das Nassgewicht und die Gesamtzellzahl blieben während der Kultivierungszeiten relativ konstant, es war keine größere Zu- oder Abnahme zu beobachten.

Auch wenn die vorliegende Arbeit das Verständnis über das Verhalten von Sauerstoff und seine Auswirkungen in tissue-engineerten Knorpelkonstrukten erweitert hat, sind dennoch weitere Untersuchungen nötig. Im Besonderen über die Einflussnahme einer erhöhten Zelldichte bei der Besiedelung der Polyurethanträger, auf die Sauerstoffwerte und die Bildung an Glykosaminoglykanen, aber auch über die Kultivierung unter reduziertem Sauerstoffpartialdruck.

## 7 Literaturverzeichnis

Aigner J, Tegeler J, Hutzeler P, Campoccia D, Pavesio A, Hammer C, Kastenbauer E, Naumann A. Cartilage tissue engineering with novel nonwoven structured biomaterial based on hyaluronic acid benzyl ester. *J Biomed Mat Res*, 42:172-181, 1998

Aigner J, Tegeler J, Hutzeler P, Campoccia D, Pavesio A, Hammer C, Kastenbauer E, Naumann A. Cartilage tissue engineering with novel nonwoven structured biomaterial based on hyaluronic acid benzyl ester. *J Biomed Mat Res*, 42:172-181, 1998

Archer CW, Francis-West P. Cells in focus, The chondrocyte. *IJBCB*, 35:401-404, 2003

Armstrong CG, Mow VC. Variations in the intrinsic mechanical properties of human articular cartilage with age, degeneration and water content. *J Bone Joint Surg*, 64:88-94, 1982

Backman P, Wadso I. Cell growth experiments using a microcalorimetric vessel equipped with oxygen and pH electrodes. *J Biochem Biophys Methods*, 23(4):283-293, 1991

Bacon JR, Demas JN. Determination of oxygen concentrations by luminescence Quenching of a polymer-immobilised transition metal complex. *Anal Chem*, 59(23):2780-2785, 1987

Barone LM. Cultured autologous chondrocyte implantation for cartilage repair. *Genzyme Tissue Repair*, Cambridge, USA, 1996

Becker W, Naumann HH, Pfaltz CR. Hals-Nasen-Ohrenheilkunde. 2. Auflage, Thieme, Stuttgart, 1986



Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*, 30(1):215-224, 1982

Bhardwaj T, Pilliar RM, Grynblas MD, Kandel RA. Effect of material geometry on cartilaginous tissue formation in vitro. *J Biomed Mat Res*, 57:190-199, 2001

Bisceglie V. Über die antineoplastische Immunität; heterologe Einpflanzung von Tumoren in Hühner-Embryonen. *Ztschr f Krebsforsch*, 40:122-140, 1933

Brighton CT, Heppenstall RB. Oxygen tension in zones of epiphyseal plate, the metaphysis and diaphysis. An in vitro and in vivo study in rats and rabbits. *J Bone Joint Surg Am*, 53:719-728, 1971

Brighton CT, Ray RD, Soble LW, Kuettner KE. In vitro epiphyseal-plate growth in various oxygen tensions. *J Bone Joint Surg Am*, 51:1383-1396, 1969

Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *New Engl J Med*, 331:889-895, 1994

Brunner FX. Implantatmaterialien-was hat sich wo und wann bewährt? *Eur Arch Otorhinolaryngol Suppl*, 1:311-336, 1993

Buckwalter JA, Rosenberg LC, Hunziker EB: Articular Cartilage: Composition, structure, response to Injury and methods of facilitating repair. In: *Articular cartilage and knee joint function*, JW Ewing (Hrsg.), Raven Press, New York. 15-56, 1990

Buija J, Sittinger M, Pitzke P, Wilmes E, Hammer C. Synthesis of human cartilage using organotypic cell culture. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 55(6):347-351, 1993

Bujia J, Wilmes E, Krombach F, Hammer C, Kastenbauer E. Detection of class II antigens on human nasal cartilage. *Am J Otolaryngol*, 11:334-339, 1990

Burdick JA, Chung C, Jia XQ, Randolph MA, Langer R. Controlled degradation and mechanical behavior of photopolymerized hyaluronic acid networks. *Biomacromolecules*, 6:386-391, 2005

Burke JF, Yannas IV, Quimby WC, Bondoc CC, Jung WK. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg*, 194:413-448, 1981

Caplan AI, Elyaderani M, Mochizuki Y, Wakitani S, Goldberg VM. Principles of cartilage repair and regeneration. *Clinic Orthop*, 254-269, 1997

Chick WL, Like AA, Lauris V. Beta cell culture on synthetic capillaries: an artificial endocrine pancreas. *Science*, 187:847-848, 1975

Chung C, Burdick JA. Engineering cartilage tissue. *Adv Drug Del Rev*, 60(2):243-262, 2008

Cohen J, Lacroix P. Bone and cartilage formation by periosteum. *J Bone Jt Surg*, 77A:717-730, 1995

Coleman RM, Case ND, Guldberg RE. Hydrogel effects on bone marrow stromal cell response to chondrogenic growth factors. *Biomaterials*, 28:2077-2086, 2007

Davis, AE. Homograft materials in otolaryngology: the risk of transmitting human immunodeficiency virus. *Clin Otolaryngol*, 13(2):159-161, 1988

Davisson T, Kunig S, Chen A, Sah R, Ratcliffe A. Static and dynamic compression modulate matrix metabolism in tissue engineered cartilage. *Journal of Orthopaedic Research*, 20:842-848, 2002

Desmukh K, Kline G. Characterisation of collagen and precursors synthesized by rabbit-articular-cartilage cells in various culture systems. *Eur J Biochem*, 69:117-123, 1976

Domm C, Schunke, Christesen K, Kurz B. Redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate culture under low oxygen tension. *Osteoarthritis Cartilage*, 10:13-22, 2002

Eiselt P, Kim BS, Chacko B, Isenberg B, Peters MC, Greene KG, Roland WD, Loeb sack AB, Burg KJ, Culberson C, Halberstadt CR, Holder WD, Mooney DJ. Development of technologies aiding large-tissue engineering. *Biotechnol Prog*, 14: 134-140, 1998

Eyrich D, Brandl F, Appel B, Wiese H, Maier G, Wenzel M, Staudenmaier R, Goepferich A, Blunk T. Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. *Biomaterials*, 28:55-65, 2007

Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochimica et Biophysica Acta*, 883(2):173-177, 1986

Ferrante B, Biessy R, Ducroz V, Gzaïel D, Leyder P. Correction of nose deviations using latero-septal grafts from irradiated bovine cartilage. *Ann Chir Plast Esthet*, 38(5):555-560, 1993

Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Biron RJ, Eagles DB, Lesnoy DC, Barlow SK, Langer R. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Biotechnology (N Y)*, 12(7):689-693, 1994

Freed LE, Vunjak-Novakovic G. Tissue Engineering of cartilage. In: The biomedical engineering handbook, JD Bronzino (Hrsg.). CRC Press, Boca Raton, Fla., USA, 1788-1806, 1995

French MM, Rose S, Canseco J, Athanasiou KA. Chondrogenic differentiation of adult dermal fibroblasts. *Annals of Biomedical Engineering*, 32(1):50-56, 2004

Gibson T, Davis WB. Some further observations on the use of p43 served bovine cartilage implants in man. *Br J Plast Surg*, 8:85-92, 1955

Green WT, Jr..Behavior of articular chondrocytes in cell culture. *Clin Orthop*, 75:248-260, 1971

Grimshaw MJ, Mason RM. Bovine articular chondrocyte function in vitro depends upon oxygen tension. *Osteoarthritis Cartilage* 8, 386-392, 2000

Guaccio A, Borselli C, Oliviero O, Netti PA. Oxygen consumption of chondrocytes in agarose and collagen gels: a comparative analysis. *Biomaterials*, 29(10):1484-1493, 2008

Hammer C, Buija J. Immunologie vitaler und konservierter Transplantate. *Oto Rhino Laryngol*, 1:2-26, 1992

Hansen U, Schunke M, Domm C, Ioannidis N, Hassenpflug J, Gehrke T, Kurz B. Combination of reduced oxygen tension and intermittent hydrostatic pressure: a useful tool in articular cartilage tissue engineering. *J Biomech*, 34(7):941-949, 2001

Hashimoto K, Fukuda K, Yamazaki K, Yamamoto N, Matsushita T, Hayakawa S, Munakata H, Hamanishi C. Hypoxia-induced hyaluronan synthesis by articular chondrocytes. The role of nitric oxide. *Inflamm res*, 55:72-77, 2006

Heywood HK, Bader DL, Lee DA. Rate of oxygen consumption by isolated articular chondrocytes is sensitive to medium glucose concentration. *J cell Physiol*, 206(2): 402, 2006

Homminga GN, Bulstra SK, Bouwmeester PSM, Linden Van Der AJ. Perichondrial grafting for cartilage lesions of the knee. *J Bone Jt Surg*, 72:1003-1007, 1990

Hu JC, Athanasiou KA. The effects of intermittent hydrostatic pressure on self-assembled articular cartilage constructs. *Tissue Engineering*, 12: 1419-1428, 2006

Huang JI, Kazumi N, Durbhakula MM, Hering TM, Yoo TM, Johnstone B. Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: a patient-matched comparison. *J Orthop Res*, 23:1383-1389, 2005

Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomater*, 21(24):2529-2543, 2000

Hwang NS, Kim MS, Sampattavanich S, Baek JH, Zhang ZJ, Elisseeff J. Effects of three-dimensional culture and growth factors on chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells. *Stem Cells*, 24:284-291, 2006

Jobsis FF. Non invasive infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen insufficiency and circulatory parameters. *Science*, 198:1264-1266, 1977

Kastenbauer ER. Konservierung und Anwendungsmöglichkeiten allogener (homologer) Transplantate im Hals-Nasen-Ohrenbereich. *HNO*, 31:371-380, 1982

Kawabe N, Yoshinao M. The repair of full-thickness articular cartilage defects: Immune responses to reparative tissue formed by allogeneic growth plate chondrocyte implants. *Clin Orthop*, 268, 279, 1991

Kellner K, Liebsch G, Klimant I, Wolfbeis OS, Blunk T, Schulz MB, Göpfrich A. Determination of oxygen gradients in engineered tissue using a fluorescent sensor. *Biotechnol Bioeng*, 80(1):73-83, 2002

Kellner K, Schulz MB, Göpferich A, Blunk T. Insulin in tissue engineering of cartilage: a potential model system for growth factor application. *J Drug Target*, 9(6):439-448, 2001

Kim YJ, Sah RL, Doong JY, Grodzinsky AJ. Fluorometric assay of DNA in cartilage explants using Hoechst 33258. *Anal Biochem*, 174(1):168-176, 1988

Kobayashi S, Meir A, Urban J. Effect of cell density on the rate of glycosaminoglycan accumulation by disc and cartilage cells in vitro. *J Orthop Res*, 26(4):493-503, 2008

Krafft T, Spitzer WJ, Bauer T. Xenogenic cartilage as a transplant for reconstruction of the facial skull. *Fortschr Kiefer Gesichtschir*, 39:183-186, 1994

Kuang Y, Walt D. Detecting oxygen consumption in the proximity of *saccharomyces cerevisiae* cells using self-assembled fluorescent nanosensors. *Biotechnol Bioeng*, 96(2):318-325, 2007

Kühn D, Luxem J, Runggaldier K. *Rettungsdienst heute*. 5. Auflage, Elsevier, München, 40-41, 2005

Lane JM, Brighton CT, Menkowitz BJ. Anaerobic and aerobic metabolism in articular cartilage. *J Rheumatol*, 4:334-342, 1977

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*, 260(5110):920-926, 1993

Langer R. Editorial: Tissue Engineering: Perspectives, Challenges and Future Directions. *Tissue Engineering*, 13(1):1-2, 2007

Layman DL, Sokoloff L, Miller EJ. Collagen synthesis by articular Chondrocytes in monolayer culture. *Exp Cell Res*, 73:107-112, 1972

Lee RB, Urban JP. Evidence for a negative Pasteur effect in articular cartilage. *Biochem J*, 321:95-102, 1997

Leonhardt H. *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. 8. Auflage, Thieme, Stuttgart, 111-152, 1990

Lewis MC, Macarthur BD, Malda J, Pettet G, Please CP. Heterogeneous proliferation within engineered cartilaginous tissue: the role of oxygen tension. *Biotechnol Bioeng*, 91(5): 607, 2005

Lu L, Zhu X, Valenzuela RG, Currier BL, Yaszemski MJ. Biodegradable polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. *Clin Orthop*, 391:251, 2001

Malda J, Martens DE, Tramper J, van Blitterswijk CA, Riesle J. Cartilage tissue engineering: Controversy in the effect of oxygen. *Critical Reviews in Biotechnology*, 23(3): 175-194, 2003

Malda J, van Blitterswijk CA, van Geffen M, Martens DE, Tramper J, Riesle J. Low oxygen tension stimulates the redifferentiation of dedifferentiated adult human nasal chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*, 12(4): 306-313, 2004a

Malda J, van den Brink P, Meeuwse P, Grojec M, Martens DE, Tramper J, Riesle J, van Blitterswijk CA. Effect of oxygen tension on adult articular chondrocytes in microcarrier bioreactor culture. *Tissue Eng*, 10(7-8):987-994, 2004b

Mauck RL, Yuan X, Tuan RS. Chondrogenic differentiation and functional maturation of bovine mesenchymal stem cells in long-term agarose culture. *Osteoarthr Cart*, 14:179-189, 2006

Moll KJ, Moll M. *Anatomie*. 18. Auflage, Elsevier, München, 91-94, 2006

Murphy CL, Polak JM. Control of human articular chondrocyte differentiation by reduced oxygen tension. *Journal of Cellular Physiology*, 199(3):451, 2004

Murphy CL, Sambanis A. Effect of oxygen tension on chondrocyte extracellular matrix accumulation. *Connect Tissue Res*, 42:87-96, 2001

O'Driscoll SW, Fitzsimmons JS, Commisso CN. Role of oxygen tension during cartilage formation by periosteum. *J Orthop Res*, 15:682-687, 1997

Obradovic B, Carrier RL, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Gas exchange is essential for bioreactor cultivation of tissue engineered cartilage. *Biotechnol Bioeng*, 63(2):197-205, 1999

Obradovic B, Martin I, Freed LE, Vunjak-Novakovic G. Bioreactor studies of natural and tissue engineered cartilage. *Ortop Traumatol rehabil*, 3(2):181-189, 2001

Obradovic B, Meldon JH, Freed LE, Vunjak-Novakovic G. Glycosaminoglycan deposition in engineered cartilage: experiments and mathematical model. *AIChE J*, 46:1860-1871, 2000



Osch van GJ, Mandl EW, Marijnissen WJ, Van der Veen SW, Verwoerd-Verhoef HL, Verhaar JA. Growth factors in cartilage tissue engineering. *Biorheology*, 39(1-2):215-220, 2002

Osch van GJ, van der Veen SW, Burger EH, Verwoerd-Verhoef HI. Chondrogenic potential of in vitro multiplied rabbit perichondrium cells cultured in alginate beads in defined medium. *Tissue Eng* 6, 321-330, 2000

Osch van GJ, van der Veen SW, Verwoerd-Verhoef HI. In vitro redifferentiation of cultur-expanded rabbit and human auricular chondrocytes for cartilage reconstruction. *Plast Reconstr Surg*, 107:433-440, 2001

Pellegrini P. Use of irradiated bovine cartilage in the correction of defects of the nasal structure. *Acta Otorhinolaryngol Ital*, 10(5):487-497, 1990

PreSens GmbH-Precision Sensing, Regensburg, Deutschland. The smart measurement method, 2007  
([www.presens.de/support/faqs/question/how-does-an-oxygen-sensor-work.html](http://www.presens.de/support/faqs/question/how-does-an-oxygen-sensor-work.html))

Probst R, Gerevers G, Iro H. Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. 3. Auflage, Thieme, Stuttgart, 2008

Puelacher WC, Kim SW, Vacanti JP, Schloo B, Mooney D, Vacanti CA. Tissue-engineered growth of cartilage: the effect of varying the concentration of chondrocytes seeded onto synthetic polymer matrices. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 23(1):49-53, 1994

Rosier RN, O'Keefe RJ, Crabb ID, Puzas JE. Transforming growth factor-beta: an autocrine regulator of chondrocytes. *Connect Tiss Res*, 20:295-301, 1989

Rotter N, Haisch A, Bücheler M. Cartilage and bone tissue engineering for reconstructive head and neck surgery. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 262:539-545, 2004

Rotter N. Untersuchungen zum in vivo Verhalten von in vitro gezüchtetem vitalen Knorpeltransplantatmaterial. Ludwig-Maximilian-Universität, München, Dissertationsarbeit, 1996

Sato T, Chen GP, Ushida T, Ishii T, Ochiai N, Tateishi T, Tanaka J. Evaluation of PLLA-collagen hybrid sponge as a scaffold for cartilage tissue engineering. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, 24:365-372, 2004

Scherer K, Schunke M, Sellckau R, Hassenpflug J, Kurz B. The influence of oxygen and hydrostatic pressure on articular chondrocytes and adherent bone marrow cells in vitro. *Biorheology*, 41:323-333, 2004

Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K. *Anatomie*. 6. Auflage, Springer, Berlin, 62-64, 1995

Scott JE. Oxygen and the connective tissues. *Trends Biochem Sci*, 17:340-343, 1992

Silver IA. Measurement of pH and ionic composition of pericellular sites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 271:261-272, 1975

Silverton SF, Wagerle LC, Robiolo ME, Haselgrove JC, Forster RE. Oxygen gradients in two regions of the epiphyseal growth plate. *Adv Exp Med Biol*, 248:809-815, 1989

Skalak RC, Fox CF. *Tissue Engineering*. 1. Auflage, Alan R Liss Inc, New York, 1998

Skodacek D. Der Einfluß von IGF-1 und TGF $\beta$ -2 auf tissue-engineerten humanen Septumknorpel. Ludwig-Maximilian-Universität, München, Dissertationarbeit, 2005.

Sobotta J. Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, Mikroskopische Anatomie. 2. Auflage, Elsevier, München, 127-131, 2006

Solchaga LA, Temenoff JS, Gao JZ, Mikos AG, Caplan AI, Goldberg VM. Repair of osteochondral defects with hyaluronan- and polyester-based scaffolds. *Osteoarthr and Cart*, 13:297-309, 2005

Stading M, Langer R. Mechanical shear properties of cell-polymer cartilage constructs. *Tissue Eng* 5, 241-250, 1999

Staudenmaier R. Ohrmuschelrekonstruktion: Wandel der Technik-Möglichkeiten durch Rapid Prototyping und Tissue Engineering von Knorpelgewebe. Habilitationsarbeit, 48-50, 2004

Starke G. Possible virus contaminants in tissue banking. *J Orthop Trauma*, 37:492-495, 1990

Stockwell RA. *Biology of cartilage cells*. Cambridge university press, 329, 1979

Vacanti JP, Langer R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet*, 354:32-34, 1999

Vacanti JP, Morse MA, Saltzman WM, Domb AJ, Perez-Atyade A, Langer R. Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J Pediatr Surg*, 23:3-9, 1988

Veilleux N, Spector M. Effects of FGF-2 and IGF-1 on adult canine articular chondrocytes in type II collagen-glycosaminoglycan scaffolds in vitro. *Osteoarthr Cart*, 13:278-286, 2005

Verwoerd-Verhoef HL, Ten Koppel PG, Van Osch GJ, Meeuwis CA, Verwoerd CD. Wound healing of cartilage structures in the head and neck region. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 43(3):241-251, 1998

Vickers SM, Squitieri LS, Spector M. Effects of cross-linking type II collagen-GAG scaffolds on chondrogenesis in vitro: Dynamic pore reduction promotes cartilage formation. *Tissue Engineering*, 12:1345-1355, 2006

Waldman SD, Couto DC, Grynblas MD, Pilliar RM, Kandel RA. A single application of cyclic loading can accelerate matrix deposition and enhance the properties of tissue-engineered cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14:323-330, 2006

Wang W, Vadgama P. O<sub>2</sub> microsensors for minimally invasive tissue monitoring. *J R Soc Interface*, 1:109-117, 2004

Woodfield TBF, Bezemer JM, Pieper JS, van Blitterswijk CA, Riesle J. Scaffolds for tissue engineering of cartilage. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 12(3):209-236, 2002

Yang S, Leong KF, Du Z, Chua C. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors *Tissue Eng*, 7(6):679-689, 2001

Zhou S, Cui Z, Urban JP. Factors influencing the oxygen concentration gradient from the synovial surface of articular cartilage to the cartilage-bone interface: a modelling study. *Arthritis Rheum*, 50(12):3915-3924, 2004

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 13:4279-4295, 2002